

Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta

Specializace ve zdravotnictví

Nutriční terapeut



Sandra Grassová, DiS.

Výskyt a negativní zdravotní účinky akrylamidu v potravinách

The occurrence and adverse health effects of acrylamide in food

Bakalářská práce

Vedoucí závěrečné práce: RNDr. Milena Bušová, CSc.

Praha, 2017

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literatury. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze dne

Sandra Grassová, DiS.

.....

Podpis

Identifikační záznam:

GRASSOVÁ, Sandra. *Výskyt a negativní zdravotní účinky akrylamidu v potravinách. [The occurrence and adverse health effects of acrylamide in food]*. Praha, 2017. 56 s., 9 obr., 7 tabulek., 3 grafy. Bakalářská práce (Bc.). Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, III. interní klinika / Ústav 1. LF UK. Vedoucí práce RNDr. Milena Bušová, CSc.

Abstrakt:

Akrylamid patří do skupiny procesních kontaminantů vznikající v potravinách s vysokým obsahem sacharidů během tepelného procesu, jako jsou pečení, smažení, grilování či pražení. Pro člověka je průmyslově vyráběný akrylamid neurotoxický a byl označen Mezinárodní agenturou pro výzkum rakoviny jako pravděpodobný lidský karcinogen. Potraviny, ve kterých se akrylamid nachází, tvoří přibližně 1/3 denního energického příjmu. Bakalářská práce se v teoretické části snaží podat ucelený přehled informací o akrylamidu – popis jeho fyzikálních a chemických vlastností, možnosti jeho průmyslového využití, možnosti jeho expozice a dietního příjmu, informace o jeho toxicitě, vzniku a výskytu v potravinách, způsoby jeho eliminace a v neposlední řadě možnosti jeho analytického stanovení. V laboratorní části bylo množství akrylamidu u vybraných potravin stanoveno kapalinovou chromatografií s tandemovou hmotnostní detekcí. Ze 42 vzorků nebyl akrylamid detekován ve dvou vzorcích extrudovaných snídaňových cereálií. Nejnižší obsah akrylamidu byl stanoven v extrudovaných snídaňových cereáliích ($45 \mu\text{g.kg}^{-1}$), zapékaném müsli a kukuřičných lupíncích. Množství akrylamidu v těchto komoditách se pohyboval v rozmezí $45\text{--}279 \mu\text{g.kg}^{-1}$. Střední hodnoty akrylamidu byly obsaženy v sušenkách. Nejvyšších hodnot bylo naměřeno u bramborových lupínků a kukuřičného popcornu, od 83 do $1550 \mu\text{g.kg}^{-1}$ a od $433 \mu\text{g.kg}^{-1}$ do $1410 \mu\text{g.kg}^{-1}$ v daném pořadí. Jedenáct výrobků, ze skupin bramborových lupínků, kukuřičného popcornu a sušenek, překročily doporučené směrné hodnoty akrylamidu stanovené doporučením Komise (2013/647/EU). Expozice akrylamidem je nevyhnutelná a zatím neexistuje potvrzení karcinogenní toxicity pro člověka. Existuje ovšem doporučení omezit rizikové potraviny s vysokým obsahem akrylamidu a volit šetrnější tepelnou úpravu pokrmů.

Klíčová slova:

Akrylamid, expozice, toxicita, potraviny, eliminace, LC/MS.

Abstract:

Acrylamide belongs to the group of process contaminants originating in foods with a high carbohydrate content during the heat process, as baking, frying, grilling, etc. For people is industrially producing acrylamide neurotoxic and according to IARC is classified probably as human carcinogen. Acrylamide which is occurred in foods, probably makes up 1/3 of daily energy supply. The Bachelor thesis tries to give a comprehensive overview in the theoretical part information about Acrylamide – a description of its physical and chemical character, possibility of its industrial use, possibility of its exposure and dietary intake, information on its toxicity, occurrence and incidence in foods, the way of its elimination and finally its possibility of analytical determination. In the laboratory, the amount of acrylamide was determined by the LC/MS method in selected foods. Of the 42 samples, acrylamide was not detected in 2 samples of extruded breakfast cereals. The lowest content of acrylamide was determined in extruded breakfast cereals ($45 \mu\text{g.kg}^{-1}$), roasted muesli and cornflakes. The amount of acrylamide in these commodities ranged from $45\text{--}279 \mu\text{g.kg}^{-1}$. Average values Acrylamide were contained in biscuits. The highest values were measured for potato chips and corn popcorn, from 83 to $1550 \mu\text{g.kg}^{-1}$ and $433 \mu\text{g.kg}^{-1}$ to $1410 \mu\text{g.kg}^{-1}$ respectively. 11 products, from group of potato chips, maize popcorn and biscuits exceeded recommendation values of Acrylamide by the Commission (2013/647/EU). For people is exposure by acrylamide inevitable and it does not exist yet confirmation of carcinogenicity to humans, but there is some recommendation how to reduce the risk food with high Acrylamide and choose more gentle cooking.

Key words:

Acrylamide, Exposure, Toxicity, Foods, Elimination, LC/MS.

Poděkování:

Ráda bych poděkovala vedoucí bakalářské práce, RNDr. Mileně Bušové, CSc., za ochotu, věcné připomínky, rady a čas, kterou mi při vytváření této práce věnovala.

Poděkování také patří rodině a blízkým za jejich nekonečnou trpělivost a podporu v průběhu studií.

OBSAH

ÚVOD	9
1 TEORETICKÁ ČÁST	10
1.1 Fyzikálně-chemické vlastnosti akrylamidu	10
1.2 Výroba a využití akrylamidu	12
1.3 Expozice akrylamidem	12
1.3.1 Nepotravinová expozice	13
1.3.2 Potravinová expozice	13
1.4 Zdravotní rizika akrylamidu	14
1.4.1 Neurotoxické účinky	15
1.4.2 Karcinogenní účinky	17
1.4.3 Reprodukční toxicita	18
1.5 Výskyt akrylamidu v potravinách	18
1.6 Mechanismus vzniku akrylamidu v potravinách	22
1.6.1 Vznik akrylamidu z asparaginu a redukujících cukrů	23
1.6.2 Alternativní možnosti vzniku akrylamidu	25
1.7 Minimalizace akrylamidu v potravinách	26
1.7.1 Pékárenské a cereální výrobky	26
1.7.2 Brambory a výrobky z nich	29
1.7.3 Káva a kávové náhražky	31
1.8 Legislativa	32
1.9 Metody analýzy akrylamidu v potravinách	34
1.9.1 Kapalinová chromatografie	34
1.9.2 Plynová chromatografie	35
2 PRAKTICKÁ ČÁST	36
2.1 Použitá metoda analýzy, přístroje a zařízení	36
2.2 Chemikálie	37
2.3 LC/MS/MS podmínky pro stanovení	37
2.4 Použitý software	38

2.5	Analyzované vzorky.....	38
2.6	Příprava vzorků	38
2.7	Výsledky a diskuze	40
3	ZÁVĚR.....	46
	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	47
	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	53
	SEZNAM OBRÁZKŮ	54
	SEZNAM TABULEK.....	54
	SEZNAM GRAFŮ	54

ÚVOD

Akrylamid se více než šedesát let používá na výrobu polyakrylamidu, který je využíván v různých chemicko-technologických oborech. Jeho polymer se využívá jako flokulant při čištění odpadních a pitných vod, těsnicí materiál při stavbě přehrad, vodních nádrží, pro zpevnění půdy při stavbě silnic, v papírenském průmyslu jako pojivo, při výrobě obalových materiálů, jako aditivum u kosmetických a průmyslových výrobků. Samotný polyakrylamid je netoxický, ovšem ve většině případů obsahuje rezidua nepolymerizovaného monomeru akrylamidu.

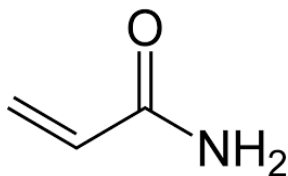
Řada studií naznačuje, že akrylamid je neurotoxický, karcinogenní, genotoxický, reprodukcí toxický u zvířat a neurotoxický pro člověka. Účinky akrylamidu jsou ve světovém měřítku nadále intenzivně studovány. Roku 1994 byl akrylamid podle IARC klasifikován jako pravděpodobný lidský karcinogen třídy 2A. Akrylamid byl také objeven v roce 2002 Švédským Národním výborem pro potraviny ve spolupráci se Stockholmskou univerzitou u některých tepelně upravených potravin. Akrylamid vzniká v potravinách s vysokým obsahem škrobu, které podléhají tepelnému záhřevu nad 120 °C (smažení, fritování, pečení, grilování a pražení). Jedná se především o smažené brambůrky, bramborové hranolky, smažené bramborové výrobky, sušenky, popcorn, snídaňové cereálie, kávu, pečivo a mnoho dalších. Nejvíce ohroženou skupinou jsou tudíž nadprůměrní konzumenti právě takto upravovaných potravin. Akrylamid nebyl nalezen v potravinách vařených, jako jsou např. brambory a rýže.

Předkládaná bakalářská práce má za cíl v teoretické části podat ucelený přehled informací o akrylamidu – popis jeho fyzikálních a chemických vlastností, možnosti jeho průmyslového využití, informace o jeho toxicitě, vzniku a výskytu v potravinách, způsoby jeho eliminace a v neposlední řadě možnosti jeho analytického stanovení.

Laboratorní část si klade za cíl zjistit množství akrylamidu u vybraných rizikových potravin s využitím metody kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí (LC/MS/MS).

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Fyzikálně-chemické vlastnosti akrylamidu



Obrázek č. 1 Strukturní vzorec akrylamidu [50]

Akrylamid (název dle IUPAC: 2-propenamid) je průmyslově vyráběná tuhá, bílá krystalická látka, bez chuti a zápachu s molekulovou hmotností $71,08 \text{ g.mol}^{-1}$. Teplota tání akrylamidu je $136 \text{ }^{\circ}\text{C}$ při $3,3 \text{ kPa}$, teplota varu $87 \text{ }^{\circ}\text{C}$ při $0,27 \text{ kPa}$ [5, 40].

Akrylamid je difunkční monomer. Ve své molekule obsahuje reaktivní elektrofilní dvojnou vazbu a amidovou skupinu. Elektrofilní dvojná vazba podléhá velkému rozsahu chemických reakcí – nukleofilní adici, Diels-Alderově reakci a radikálovým reakcím jako např. alkylaci proteinových a neproteinových SH skupin (cystein, homocystein, glutation), N-terminálních NH_2 skupin valinových reziduí hemoglobinu a NH_2 skupin guaninu a jiných nukleových kyselin. Reakce koncového zbytku amidu zahrnující hydrolýzu, dehydrataci, alkoholýzu a kondenzaci s aldehydy, byly diskutovány ve snaze o ovlivnění mechanismu tvorby akrylamidu a jeho vlivu na zdraví. Akrylamid je také schopen se slučovat s méně kyselými kovovými ionty přes kyslíkový atom v karbonylové skupině, dusíkový atom nebo olefin. V molekule akrylamidu jsou obsaženy chromofory pro UV detekci. Vykazuje vlastnosti slabé kyseliny i zásady [18, 21, 24, 25].



Obrázek č. 2 Krystalická forma akrylamidu [51]

Akrylamid je velmi dobře rozpustný ve vodě, v nižších alkoholech (methanol a ethanol) a v polárních rozpouštědlech (acetonitril, ethylacetát, aceton). Prakticky nerozpustný je v nepolárních organických rozpouštědlech, jako jsou heptan či tetrachlormetan [5, 48]. Rozpustnost v různých rozpouštědlech znázorňuje Tabulka č. 1.

Tabulka č. 1 Rozpustnost akrylamidu při 30 °C [48]

Rozpouštědlo	Rozpustnost [g.dm⁻³]
Voda	2151
Methanol	1550
Dimethyl sulfid	1240
Dimethyl formamid	1190
Ethanol	862
Aceton	631
Acetonitril	396
Ethylacetát	126
Chloroform	26,6
Benzen	3,46
Heptan	0,068

Akrylamid je komerčně dostupný ve formě pevné krystalické látky, 30% nebo 50% vodný roztok. Akrylamidové krystaly mohou vytvářet prach, který je na vzduchu hořlavý a může dojít k explozi. Za laboratorních podmínek je krystalická forma stabilní a má dlouhou skladovací životnost, ale může polymerizovat při zahřátí, oxidativním působení, eventuálně při vystavení UV záření za vzniku polyakrylamid. Polymery jsou hydrofilní s molekulovou hmotností v rozmezí 1 až 30 milionů s délkou řetězce mezi 14 000 až 420 000 monomerních jednotek. Proces polymerace není 100 % kompletní a polymery mají vždy různé zbytkové množství nezreagovaného monomeru. Při rozkladu akrylamidu za vyšších teplot vzniká štiplavý dým s oxidy dusíku, oxidem uhličitým, oxidem uhelnatým a amoniakem. Kapalná forma akrylamidu polymerizuje rychleji [5, 8, 21, 24].

1.2 Výroba a využití akrylamidu

Poprvé byl akrylamid vyroben roku 1893 v Německu. Komerční produkce začala až v roce 1954. Výroba akrylamidu je založena na katalytické hydrataci akrylonitrilu s vodou za přítomnosti katalyzátoru na bázi mědi při teplotě 85 °C [5, 8, 20].

Největší objem akrylamidu byl produkován v Japonsku, USA a Evropě. Roční produkce v USA a Japonsku se v roce 1980 pohybovala okolo 40 000 tun v každé z těchto zemí. V roce 1993 činila výrobní kapacita tří hlavních amerických výrobců akrylamidu zhruba 75 000 tun. Roku 1995 činila celková produkce v Evropské unii 80 000 až 100 000 tun. V roce 2008 bylo v USA vyrobeno přibližně 141 000 tun akrylamidu [5, 8, 46].

Celkem 99 % akrylamidu je výhradně používáno pro syntézu polyakrylamidu. Minoritní je užití akrylamidu zahrnující přípravu polyakrylamidových gelů pro výzkumné účely a jako injektážní činidlo ve stavebnictví. Polyakrylamid je využíván v různých aplikacích. Přibližně 80–90 % produkovaného polyakrylamidu se v chemicko-technologickém průmyslu používá zejména jako flokulant při čištění odpadních a městských vod či vod znečištěných při výrobě celulózy a papíru (polyakrylamid je technologický prostředek k odstranění koloidní fáze, kterou nelze vyloučit z vody usazováním). Slouží taktéž jako flokulant při zpracování rudy. Řadu využití má i v dalších odvětvích. Používá se jako těsnicí materiál při stavbě přehrad, vodních nádrží a tunelů, pro zpevnění půdy, při stavbě silnic, v papírenském průmyslu jako pojivo při výrobě papírů a obalových materiálů používaných v potravinářství, v kosmetickém průmyslu jako aditivum (zahušťovadlo) a jako půdní kondicionér, při těžbě ropy i v textilním průmyslu. V textilním průmyslu slouží jako mazivo při barvení textilních látek, kdy gel s obsahem akrylamidového polymeru brání shlukování barevných pigmentů a zajišťuje rovnoměrnou disperzi barvy [5, 8, 21, 24, 31].

Polyakrylamid je netoxický, ovšem obsahuje rezidua akrylamidu, který toxické účinky vykazuje. Vzhledem k potenciálnímu riziku vystavení zbytkovému monomeru v polyakrylamidu, bylo jeho použití v řadě zemí regulováno (v kosmetice, při úpravě pitné vody, v papírech a obalových materiálech užívaných v potravinářství) [5, 8, 21, 46].

1.3 Expozice akrylamidem

Před rokem 2002 bylo za zdroje akrylamidu považováno především pracovní prostředí, dále cigaretový kouř, pitná voda a kosmetika. Nicméně v roce 2002 švédští vědci ohlásili přítomnost akrylamidu v některých potravinách denní spotřeby. Akrylamid může být do těla vstřebáván gastrointestinálním traktem, inhalací nebo kůží [24, 26, 46].

1.3.1 Nepotravinová expozice

K hlavní expozici akrylamidem dochází v pracovním prostředí – při výrobě a použití monomeru akrylamidu, výrobě polyakrylamidu a při přípravě polyakrylamidových gelů používaných pro elektroforézu. Profesní expozice jsou pravděpodobně výsledkem vdechování (krystalického nebo práškového monomeru nebo aerosolu akrylamidového roztoku) a dermální expozice (monomeru z roztoku) [5, 8, 19].

Expozici zbytkovým monomerem akrylamidu může být populace vystavena z pitné vody, kosmetických přípravků, obalů používaných při balení potravin, ostatních domácích potřeb nebo při kouření, eventuálně pasivním kouření [21, 35, 46].

Akrylamid obsahuje i tabákový kouř, což indikuje jeho tvorbu během zahřívání biologických materiálů. Při denní spotřebě přibližně 20 cigaret s obsahem 1–2 μg akrylamidu na jednu cigaretu představuje příjem akrylamidu 0,5 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ tělesné hmotnosti za den [19, 46, 49].

Povolený obsah reziduí akrylamidu v polyakrylamidu používaného na úpravu pitné vody je v USA stanoven na 0,05 % a v Evropské unii je limit reziduí akrylamidu stanovený na 0,1 %. Expozice z upravené pitné vody po použití polyakrylamidových flokulantů se pohybuje okolo 3,6 ng.kg^{-1} tělesné hmotnosti za den [19, 49].

Z kosmetických přípravků se obsah akrylamidu postupně zredukoval z hodnot 100 mg.kg^{-1} na úroveň pod 0,5 mg.kg^{-1} . Denní příjem akrylamidu z kosmetických výrobků se odhaduje na 0,7 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ tělesné hmotnosti za den [19, 49].

1.3.2 Potravinová expozice

Expozici akrylamidem je vystavena velká část populace. Potraviny, ve kterých se akrylamid nachází, tvoří přibližně 1/3 denního energetického příjmu. Odhad dietární expozice je zatížen mnoha faktory: množstvím akrylamidu v konkrétní potravíně, velikostí spotřebované porce, četností spotřeby, způsobem vaření, rozdíly v rámci jednotlivých komodit výrobků (složení, způsob zpracování, skladování aj.) [19, 37].

Největší podíl na dietární expozici akrylamidem západní populace mají následující potraviny: smažené bramborové hranolky (16–30 %), smažené bramborové lupínky (6–46 %), káva (13–39 %), pečivo a sladké sušenky (10–20 %), chléb a křehký chléb (10–30 %). Podíl ostatních potravin na celkové expozici je menší než 10 %. Smažené a pečené brambory, pekárenské výrobky a káva jsou nejčastějším zdrojem akrylamidu ve všech zemích [15, 37].

Podle prvních údajů WHO byl odhad průměrného denního příjmu akrylamidu z potravin 0,3–0,8 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ tělesné hmotnosti. Zpráva z výboru JEFSA z února 2005 uvádí, že se průměrný příjem akrylamidu v celé populaci odhaduje na 1 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ tělesné hmotnosti a pro konzumenty s vysokým příjmem (včetně dětí a mládeže) až 4 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ tělesné

hmotnosti. U mladších konzumentů je třeba brát v úvahu jejich nižší tělesnou hmotnost a odlišné stravovací návyky. Děti přijímají více akrylamidu oproti dospělým pravděpodobně z důvodu vyššího kalorického příjmu v poměru k tělesné hmotnosti. Zároveň je jejich spotřeba vyšší u některých potravin „bohatých“ na akrylamid, příkladem jsou hranolky a bramborové lupínky [18, 19, 23].

Poslední vědecké stanovisko EFSA (2015) týkající se akrylamidu v potravinách je zaměřeno na jeho expozici u výzkumného vzorku čítajícího 61 338 jednotlivců ze 17 různých evropských zemí a různých věkových skupin. Výzkum prokázal, že nejvíce exponovanými skupinami byli kojenci, batolata a děti. Většina ze vzorku byla exponována akrylamidem v rozmezí 1,9 až 3,4 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ tělesné hmotnosti za den. Chronická dietní expozice u dospívajících, dospělých, starších a velmi starých byla mezi 0,6 až 2,0 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ tělesné hmotnosti za den [3].

Tabulka č. 2 Expozice akrylamidem u různých věkových skupin [3]

Věková skupina	$\mu\text{g.kg}^{-1}$ tělesné hmotnosti za den		P95, $\mu\text{g.kg}^{-1}$ tělesné hmotnosti za den	
	Medián [Minimum – Maximum]		Medián [Minimum – Maximum]	
	LB	UB	LB	UB
Novorozenci	0.8 [0.5–1.4]	1.0 [0.7–1.6]	1.8 [1.4–2.3]	2.1 [1.6–2.5]
Kojenci	1.3 [0.9–1.9]	1.4 [0.9–1.9]	2.3 [1.4–3.4]	2.4 [1.5–3.4]
Ostatní děti	1.2 [0.9–1.6]	1.2 [0.9–1.6]	2.2 [1.4–3.2]	2.3 [1.4–3.2]
Dospívající	0.7 [0.4–0.9]	0.7 [0.4–0.9]	1.4 [0.9–2.0]	1.4 [0.9–2.0]
Dospělí	0.5 [0.4–0.6]	0.5 [0.4–0.6]	1.0 [0.8–1.3]	1.0 [0.8–1.3]
Starší	0.4 [0.4–0.5]	0.5 [0.4–0.5]	0.8 [0.7–1.0]	0.9 [0.7–1.0]
Velmi staří	0.4 [0.4–0.5]	0.5 [0.4–0.6]	0.9 [0.6–1.0]	0.9 [0.6–1.0]

LB: dolní mez; UB: horní mez; P95: 95. percentil.

1.4 Zdravotní rizika akrylamidu

Je známo, že akrylamid je neurotoxický, karcinogenní, genotoxický, reprodukčně toxický u zvířat a neurotoxický pro člověka (pracovní expozice). Na základě zjištění karcinogenity u zvířat byl roku 1994 podle IARC klasifikován jako pravděpodobný lidský karcinogen – třídy 2A [21, 24, 35].

Akrylamid může být do těla vstřebáván přes kůži, inhalací a gastrointestinálním traktem. Akrylamid je malá, hydrofilní molekula a díky tomu je bez ohledu na absorpční trasy relativně rychle distribuován do všech tkání včetně plodu. Hodnoty akrylamidu byly

naměřené např. v brzlíku, játrech, srdci, mozku, ledvinách a placentě. Byl rovněž zjištěn v mateřském mléce nejen hlodavců, ale i člověka [15, 18, 21,34].

Hlavními metabolity akrylamidu jsou konjugáty s glutationem a epoxid glycidamid vzniklý oxidací akrylamidu cytochromem P450 v játrech. Akrylamid i glycidamid se mohou kovalentně vázat na nukleofilní místa biologických makromolekul, především proteinů a dusíkatých nukleových kyselin. Tato schopnost může vést ke změně funkčnosti bílkovin, a tím způsobovat rakovinu. Akrylamid i glycidamid se vážou na molekuly, jako jsou hemoglobin, DNA a enzymy. Studie naznačují, že glycidamid má pravděpodobně karcinogenní a genotoxické účinky. Během 72 hodin je většina akrylamidu a jeho metabolitů v podobě konjugátů s merkaptokyselinami vyloučena močí. Adukty hemoglobinu s akrylamidem, glycidamidem a metabolity merkapturových kyselin v moči se využívají jako biomarkery expozice akrylamidu [15, 18, 23, 24, 26].

Na základě výsledků studií akutní toxicity je střední letální dávka (LD_{50}), tj. dávka smrtelná pro 50 % testovaných organismů následující: perorální letální dávka (LD_{50}) hladiny akrylamidu je u krys 107–251 $mg.kg^{-1}$ a u morčat 150–180 $mg.kg^{-1}$, vedle toho u myši bylo uvedeno rozmezí 107 až 170 $mg.kg^{-1}$. U králíků byla hodnota akrylamid LD_{50} dána na úrovni 150 $mg.kg^{-1}$. Nicméně dermální LD_{50} pro krysy je 400 $mg.kg^{-1}$, zatímco u králíků byla zjištěna hodnota LD_{50} 1680 $mg.kg^{-1}$ [23].

Při hodnocení výsledků studií s čistým akrylamidem je nutné brát v potaz, že jeho účinky nejsou relevantní s akrylamidem obsaženým v potravinách. Potraviny obsahují i jiné složky – ať už s protektivním charakterem (antioxidační silné aminokyseliny, flavonové antioxidy, fenolové antioxidy, rostlinné amidázy, které mají schopnost hydrolyzovat akrylamid) nebo jiné potencionálně toxické látky (aflatoxiny B1, G1, furfuralaldehyd, heterocyklické aminy, glykoalkaloidy apod.) [17, 24].

V literatuře se udává, že některé složky potravin jsou schopny zmírnit toxicitu tohoto procesního kontaminantu. Řadí se k nim polyfenoly obsažené v zeleném čaji, resveratrol z hroznů, diethyltrisulfidy v česneku, flavonoidy z citrusů a rajčat. Bylo prokázáno, že přípravy s bramborovou vlákninou mohou zmírnit negativní dopad na strukturu a inervaci střevní stěny u myši. Doplnky stravy obsahující selen měly zase preventivní vliv na biochemické změny v játrech krys. Rybí olej měl neuroprotektivní vliv u poškození neuronů krys způsobený akrylamidem. Léčba gangliosidy zase stimulovala regenerativní procesy v nervových buňkách, které byly účinky akrylamidu poškozeny. Adrenokortikotropní hormon (ACTH) a příbuzné peptidy zlepšovaly u krys rekonvalescenci při postižení neuropatií [13, 17, 32].

1.4.1 Neurotoxické účinky

Hlavním místem toxického působení akrylamidu je především nervový systém – centrální i periferní soustava. Neurotoxické účinky akrylamidu byly prokázány

u laboratorních zvířat in vivo a in vitro. U laboratorních zvířat, jako jsou hlodavci, morčata, králíci, psi a kočky, vedly opakované denní expozice akrylamidu v dávkách od 0,5 do 50 mg.kg⁻¹ k neurologickým příznakům připomínající neurotoxicitu pozorovanou u lidí. Jak píše Sobotka, 2014 „*Těmito pokusy bylo prokázáno, že akrylamid inhibuje aktivitu některých enzymů, zejména celkovou enolázovou aktivitu, dále glyceraldehyd-3-fosfát-dehydrogenázu, fosfofruktokinázu a tak zasahuje do glykolytických procesů. Tento mechanismus je základem glykolytické hypotézy vzniku neuropatie*“ [12, s. 53]. Dále bylo zjištěno, že dochází ke snížení amplitudy akčního potenciálu senzitivních nervů a ke zpomalení vedení senzitivními nervy. U motorických nervů dochází k mírnému zpomalení vedení nervem. Senzitivní nervy jsou postiženy více než motorické. Pokusy na krysách prokázaly, že akrylamid snižuje koncentraci neurotransmiterů v centrálním nervovém systému (norepinefrin, dopamin a serotonin). Ukázalo se, že akrylamid má selektivní efekt na dopaminový systém [12, 13, 32].

Pracovníci, kteří byli vystaveni inhalační nebo dermální expozici akrylamidem, vykazovali ve vysoké míře parestezie v rukou a nohou, křeče v nohách, Raynaudův syndrom horních i dolních končetin, pocení, podráždění kůže, olupování kůže na rukou, bolesti hlavy a dušnost. Příznaky se objevily po několika týdnech od předchozího kontaktu s látkou. Obvyklé první patologické projevy byly kožní vyrážka na rukou a nohou, pocení a odlupování pokožky. Tyto symptomy byly následovány neurologickými příznaky ve formě neuropatie (svalová slabost a změněná citlivost končetin). Další popsané příznaky byly – třes rukou, snížená citlivost, mravenčení končetin, otupělost, únava, nespavost, slabost svalů, zhoršená koordinace pohybů, bolest, křeče, neurovegetativní a neurotické poruchy, nechutenství, zvracení, průjem i snížení tělesné hmotnosti. U pracovníků byl pozorován častý výskyt alergické kontaktní dermatitidy spojené se svědivou vyrážkou, zarudnutím a ztvrdnutím kůže. Pracovníci vykazovali i astma z povolání. Dlouhodobé vystavení organismu účinkům akrylamidu způsobovalo degenerativní změny periferních nervů. Byla prokázána degenerace nervových zakončení v mozkových oblastech důležitých pro učení, paměť a ostatní kognitivní funkce (mozkovou kůru, thalamus, hypothalamus). V důsledku poškození nervového zakončení může akrylamid přispívat i k rozvoji Alzheimerovy choroby. NOAEL pro neuropatii je 0,5 mg.kg⁻¹ za den [12, 13, 20, 32, 34]. Případové studie neurotoxicity akrylamidu u lidí shrnuje Tabulka č. 3.

Tabulka č. 3 Neurotoxita akrylamidu (případové studie v literatuře) [32]

Studie	Pacienti	Druh práce	Expozice	Příznaky
Mulloy, K.B. 1996	2 pracovníci ze Západní Virginie	Pracovníci uhelných dolů	Více než desetiletá expozice flokulantům polyakrylamidu kontaminovaných monomerem akrylamidu	Pacient A: parkinsonismus, Pacient B: periferní neuropenie, neurologické potíže s močovým měchýřem
Calleman, C.J. et al. 1994	41 pracovníků z města Xinxiang	Pracovníci byli silně vystaveni směsi akrylamidu a akrylonitrilu	Akrylamid a akrylonitril	Periferní neuropatie
Myers, J.E. et al. 1991	Tovární dělníci v Jihoafrické republice	Dělníci vyrábějící polymer z monomerů akrylamidu	Akrylamid monomer	Periferní neuropatie, poruchy chůze, kožní abnormality
Auld, R.B. et al. 1967	Pracovníci v Bathurst	Horníci	10% vodný roztok akrylamidu	Periferní neuropatie
Kesson, C.M. et al. 1977	6 pracovníků z Anglie	Stavební pracovníci tunelů	Akrylamid monomer	Periferní neuropatie. Dva pracovníci zasažení mnohem vážněji než ostatní
Garland, T.O. et al. 1967	6 pracovníků z Anglie	Polymerace monomeru akrylamidu při výrobě flokulantů	Akrylamid monomer	Periferní neuropatie, poškození středního mozku
He, F. et al. 1989	71 pracovníků z Číny	Pracovníci menších továren	Vodný roztok monomeru akrylamidu	Periferní neuropatie, poruchy mozečku (3 pacienti), kožní abnormality
Kjuus, H. et al. 2004	24 pracovníků z Norska	Pracovníci tunelů	N-methylolacrylamid (NMA) – obsažený v maltě a vodě	Periferní neuropatie (parestésie, bolest a slabost končetin), kožní abnormality
Goffeng, L.O. et al. 2008	44 pracovníků z Norska	Pracovníci tunelů	N-methylolacrylamid (NMA) – obsažený v maltě a vodě	Mírně snížená citlivost na světlo a rozlišování barev

1.4.2 Karcinogenní účinky

Akrylamid je multiorganový karcinogen u samic i samců hlodavců. Dvouroční test na potkanech (samcích i samicích), kteří byli vystaveni akrylamidu v pitné vodě, prokázal zvýšené riziko nádorů centrálního nervového systému, jater, plic, kůže, štítné žlázy, nadledvin, dělohy, prsní žlázy a dalších orgánů [5, 20, 26, 35].

Bylo prokázáno, že je akrylamid v organismu metabolizován enzymem P450 na toxičtější produkt epoxid glycidamid. Tento epoxid vyvolává poškození chromozomů a navozuje karcinogenní účinky u hlodavců. Akrylamid je hydrofilní povahy a je schopen pronikat do celého organismu [20, 28, 35].

Podle matematických modelů různých institucí lze při celoživotní expozici dávkou akrylamidu $1 \mu\text{g.kg}^{-1}$ tělesné hmotnosti za den očekávat pravděpodobnost zvýšení počtu nádorových onemocnění: 4,5/1000 osob (dle EPA), 0,7/1000 osob (dle WHO) a 10/1000 osob (dle Granath, Stockholm University). Ovšem dosavadní vědecké poznatky neumožňují jednoznačně zhodnotit riziko vzniku rakoviny u běžné populace v důsledku dietární expozice akrylamidu, a to jak u nekuřáků, tak i u kuřáků. Asociace byla pozorována mezi příjmem akrylamidu a zvyšujícím se rizikem rakoviny endometria, vaječníků a ledvin. Diskuse o potenciálních karcinogenních účincích dietní expozice akrylamidu je stále otevřená [12, 20, 32, 35].

1.4.3 Reprodukční toxicita

K prokázání účinků akrylamidu na reprodukci a vývoj člověka neexistují žádná ověřená data. Výzkumem reprodukční toxicity u hlodavců bylo prokázáno, že samci vykazují menší plodnost z důvodu nepříznivého vlivu akrylamidu na počet a morfologii spermií. U samic nebyl pozorován negativní účinek na plodnost nebo reprodukci kromě mírného snížení tělesné hmotnosti mláďat [20, 24, 26]. Sobotka, 2015 píše, že „*Norská kohortová studie na matkách a dětech prokázala, že příjem akrylamidu v období těhotenství byl negativně spojován s růstem plodu*“ [13, s. 35].

Reprodukční toxicita dále spočívá v negativním působení na funkci bílkoviny *kinetin*. Tato bílkovina se nachází jak v nervové tkáni, tak i v dalších tkáních, včetně bičíku spermií. Degradace kinetinu snižuje pohyblivost spermií [20, 24].

Akrylamid také může neurotoxicky ovlivnit páření zvířat, následkem je slabost zadních končetin samců. Negativní vliv má i na hladinu hormonu testosteronu. U prostaty nebyla dosud prokázána souvislost mezi příjmem této látky a vznikem rakoviny [5, 20, 24].

1.5 Výskyt akrylamidu v potravinách

Nález akrylamidu v potravinách se pojí s nehodou z roku 1997, ke které došlo v Hallandsås na jihovýchodě Švédska. Při výstavbě železničního tunelu došlo vlivem technické chyby k úniku akrylamidu do životního prostředí. Akrylamid vyvolal u stavebních dělníků akutní neurotoxické symptomy. Zasažena byla i hospodářská zvířata a živočišné žijící v dané lokalitě. Došlo ke kontaminaci povrchových vod, což vedlo k masivnímu úhynu ryb. V rámci navazujícího vyšetřování byly sledovány koncentrace expozičního aduktu akrylamid-hemoglobinu. Akrylamid byl nalezen v krvi jak dělníků pracujících v tunelu, tak u lidí z kontrolní neexponované skupiny. Postupným vyšetřováním bylo zjištěno, že zdrojem akrylamidu byly tepelně zpracované sacharidové potraviny rostlinného původu [8, 15, 24, 26].

Výsledky z dubna roku 2002, které zveřejnil Švédský národní výbor pro potraviny a vědci ze Stockholmské univerzity, svědčí o nečekaně vysoké koncentraci akrylamidu

v některých potravinách denní spotřeby. Problematikou akrylamidu v potravinách se zabývají Evropská komise, EFSA, WHO/FAO, JIFSAN, Codex Alimentarius – CC FAC aj. Studují jeho mechanismus vzniku, možnosti jeho eliminace a zdravotní rizika. Monitorují hladiny akrylamidu v potravinách a jejich databáze jsou průběžně aktualizovány [19, 20, 26, 28, 38].

Akrylamid se do potravin nepřidává v žádné formě, jeho přítomnost je zapříčiněná především tepelnou úpravou potravin. Zbytkové množství akrylamidu je v potravinách kontaminovaných obalovými materiály, vodou či půdou ovšem velice nízké. Tyto zdroje kontaminace jsou nepravděpodobnou příčinou vysokých hodnot tohoto endogenního kontaminantu v potravinách upravovaných během tepelného procesu. Akrylamid vzniká především v potravinách rostlinného původu s vysokým obsahem sacharidů, které jsou vystaveny teplotám vyšším než 120 °C – při smažení, pečení, grilování nebo pražení. Syrové nebo vařené potraviny akrylamid neobsahují vůbec nebo jen ve stopovém množství. Různé druhy potravin a pokrmů, ať už připravovaných průmyslně nebo doma, obsahují akrylamid v rozmezí od několika $\mu\text{g.kg}^{-1}$ až po 1000 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ i více [20, 21, 28, 46].

Velký rozdíl v hladině akrylamidu byl zaznamenán v různých kategoriích potravin, stejně jako v různých značkách stejné kategorie (např. hranolky, bramboráky, bramborové lupínky) nebo i stejných výrobků odlišných šarží. Příčinou se zdají být příkladně rozdílné podmínky zpracování (teplota, doba přípravy, druh oleje na smažení aj.) nebo změna v kvalitě surovin [24, 28].

Mezi rizikové potraviny patří brambory a výrobky z nich zpracované na bramborové lupínky, hranolky, pečené brambory aj. Obsah akrylamidu ve smažených bramborových lupíncích může dosahovat hodnot až 5312 $\mu\text{g.kg}^{-1}$, ovšem jsou uváděny i nízké hodnoty 55,1 $\mu\text{g.kg}^{-1}$. Výsledný obsah akrylamidu je ovlivněn mnoha faktory, důležitá je zejména konečná fáze zpracování. Finální výrobky by měly mít světlou zlatavou barvu [18, 20].

Mezi rizikové výrobky z obilnin s vysokým obsahem akrylamidu patří snídaňové cereálie, sušenky, opatky, kreky, perníky a chléb, resp. chlebová kůrka. Obsah akrylamidu je vzhledem k používání široké škály nejrozličnějších obilovin, receptur, přísad a výrobních postupů různorodý [14, 33].

Obsah akrylamidu ve snídaňových cereáliích je velmi různý: některé studie uvádějí obsah akrylamidu v rozmezí 44 až 121 $\mu\text{g.kg}^{-1}$, jiné i hodnoty 204–560 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ [20].

V sušenkách je koncentrace akrylamidu závislá na receptuře (druh kypřícího prášku), technologickém zpracování (vlhkost) či finální úpravě. Obsah akrylamidu se pohybuje okolo 44 a 121 $\mu\text{g.kg}^{-1}$, ale byly naměřeny i vyšší hodnoty 240–560 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ [20].

Chléb obsahuje akrylamid především ve své kůrce. Množství tohoto procesního kontaminantu ovlivňuje zejména druh a stupeň vymletí mouky. Důležitou roli hrají i fermentace, podmínky kvašení, použití kyselin citronové či mléčné, doba a teplota pečení. V pšeničném chlebu byly zjištěny hodnoty akrylamidu v rozmezí 15–161 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ a v žitném 68 až 205 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ [20].

K dalším rizikovým potravinám patří káva a kávovinové náhražky. Pražená zrnková káva obsahuje od 40 do 400 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ akrylamidu, instantní káva může mít až 500 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ akrylamidu. Pražené kávovinové směsi dosahují vysokých koncentrací akrylamidu, udává se hodnota až 4000 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ [20].

Velkou pozornost má i dětská výživa, která obsahuje většinou nejen obilnou bázi, ale i další složky (med, fruktosa, ovoce aj.), které hodnoty akrylamidu zvyšují [20].

Tepelně zpracované potraviny živočišného původu, jako jsou maso a ryby, vykazují zanedbatelné množství akrylamidu. Překvapivě vysoké hodnoty (až 1000 $\mu\text{g.kg}^{-1}$) byly zjištěny v sušeném ovoci (švestky, hrušky, meruňky aj.). Nicméně akrylamid obsahují i lískové oříšky, mandle a olivy [15, 18, 46]. Hlavní skupiny potravin s nejčastějším výskytem akrylamidu jsou uvedené v Tabulce č. 4.

Tabulka č. 4 Koncentrace akrylamidu v potravinách [19]

Potravinové produkty	Koncentrace akrylamidu [μg.kg ⁻¹]	
	střední hodnota	max.hodnota
Cereálie a cereální produkty	343	7834
Cereálie a těstoviny surové a vařené	15	47
Cereálie a těstoviny zpracované (opékané, smažené, grilované)	123	820
Produkty na báze cereálie, všechny	366	7834
Chléb a rohlíky	446	3436
Pečivo a kekсы	350	7834
Snídaňové cereálie	96	1346
Ryby a mořské produkty	25	233
Maso a vnitřnosti	19	313
Mléko a mléčné produkty	5,8	36
Ořechy a olejniny	84	1925
Bramborové pyrě/bramborová kaše/vařené brambory	16	69
Pečené brambory	169	1270
Bramborové lupínky	752	4080
Bramborové hranolky	334	5312
Bramborové krokety (mražené)	110	750
Káva (výluh), hotová	13	116
Káva (mletá, instantní anebo pražená, ne výluh)	288	1291
Kávové extrakty	1100	4948
Bezkofeinová káva	668	5399
Kávoviny	845	7300
Kakaové produkty	220	909
Zelený čaj („pražený“)	306	660
Cukrovinky a med (hlavně čokoláda)	24	112
Zelenina	17	202
Surová, vařená anebo konzervovaná	4,2	25
Tepelně zpracovaná (opékaná, pečená, smažená, grilovaná)	59	202
Ovoce čerstvé	<1	10
Ovoce sušené, smažené, tepelně zpracované	131	770
Alkoholické nápoje (pivo, gin, víno)	6,6	46
Chutňové přísady a omáčky	71	1168
Sušené mléko pro dětskou výživu	<5	15
Dětská výživa (konzervovaná, zavařená)	22	121
Dětská výživa (sušená)	16	73
Dětská výživa (piškoty, suchary atd.)	181	1217
Sušené potraviny	121	1184

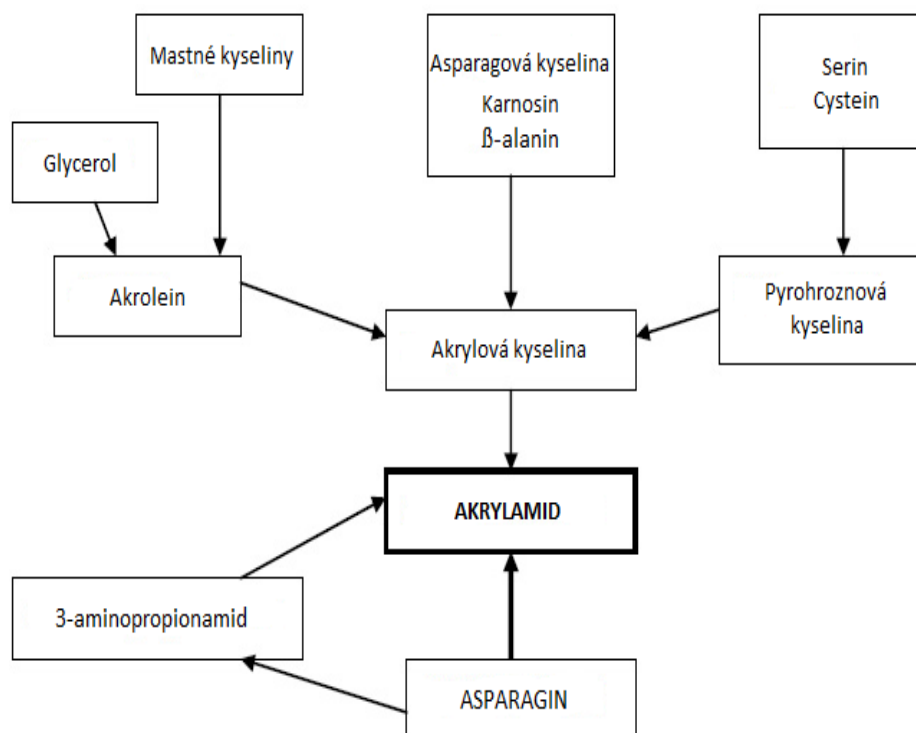
1.6 Mechanismus vzniku akrylamidu v potravinách

Ze závěrů rozsáhlých studií zaměřených na objasnění mechanismu vzniku akrylamidu v tepelně zpracovaných potravinách vyplývá, že pro úroveň kontaminace finálního výrobku jsou rozhodující tyto faktory: obsah redukujících cukrů, asparaginu a volných aminokyselin ve výchozí surovině, teplota při zpracování a výrobě, hodnota pH, obsah vody a použití aditivních látek [15].

Přítomnost akrylamidu je nejčastěji způsobena samotnou tepelnou úpravou potravin. Akrylamid se nejčastěji tvoří při teplotě 120–210 °C, nejvíce ho vzniká v tepelném rozmezí 120–170 °C. Ovšem jeho tvorba je možná již při 100 °C. V potravinách vzniká akrylamid různými mechanismy, které zahrnují reakce sacharidů, proteinů a aminokyselin, lipidů a dalších minoritních složek [19, 20, 28].

Základním reakčním mechanismem vedoucím ke tvorbě akrylamidu je považována reakce mezi volnou geneticky kódovanou neesenciální aminokyselinou asparaginem a redukujícími cukry (fruktóza a glukóza) nebo karbonylovými sloučeninami v Maillardově reakci. V nepřítomnosti redukujících cukrů nebo jiných α -hydroxykarbonylových či α -dikarbonylových sloučenin dochází jen k deaminaci asparaginu za vzniku kyseliny fumaramové. Maillardova reakce, známá jako neenzymové hnědnutí, patří mezi nejvýznamnější a nejrozšířenější chemické reakce, které probírají v průběhu tepelného zpracování a skladování potravin. Průvodním jevem těchto reakcí je tvorba hnědých pigmentů, melanoidinů. Zároveň dochází ke vzniku žádoucích sensoricky aktivních sloučenin, které dodávají produktu charakteristické zbarvení, vůni a chuť, ale i k tvorbě některých toxických sloučenin s mutagenními karcinogenními a cytotoxickými vlastnostmi (např. heterocyklické aminy, nitrosaminy, polycyklické uhlovodíky i akrylamid) [15, 18, 19, 20, 28].

Velíšek, 2009, dodává „Pro úplnost je třeba dodat, že stopová množství akrylamidu mohou při zpracování vznikat i z prekursorů jiných než je asparagin, např. z akroleinu či akrylové kyseliny. Příspěvek takto vzniklého akrylamidu k celkovému obsahu v potravinách je však zcela marginální“ [15, s. 413]. Možné prekurzory pro vznik akrylamidu naznačuje Obrázek č. 3.



Obrázek č. 3 Způsob tvorby akrylamidu v potravinách [37]

1.6.1 Vznik akrylamidu z asparaginu a redukujících cukrů

Reakce prochází třemi následujícími fázemi. *Počáteční fáze* začíná reakcí redukujících cukrů nebo karbonylových sloučenin s asparaginem za vzniku N-glykosylasparaginu. Vzniklý produkt dehydratuje za vysoké teploty a vzniká Schiffova báze. Ve vodném prostředí Schiffova báze dekarboxyluje na příslušný azomethinylid. Další možností přeměny je vznik betain Schiffovy báze, eventuálně dochází k Amadoriho přesmyku na ketosamin. Ketosamin není přímým významným prekurzorem akrylamidu, spíše se podílí na vzniku sensoricky aktivních látek. Ve *střední fázi* dochází k dehydrataci a fragmentaci sacharidů doprovázející Streckerovu degradaci aminokyselin. Azomethinylid vzniká z Schiffových bází. Azomethinylid poskytuje dekarboxylací příslušný imin. Imin může reagovat dvěma způsoby, může hydrolyzovat na původní cukr a 3-aminopropionamid a následně deaminací aminopropionamidu vznikne akrylamid. Imin může také isomerovat na dekarboxylovanou Amadoriho sloučeninu nebo hydrolyzovat na Streckerův aldehyd asparaginu a 1-amino-1-deoxyalditol. V *konečné fázi* prochází Streckerův aldehyd dalšími redukčními a dehydratačními reakcemi za vzniku akrylamidu [15, 19, 28, 38, 48]. Znázorněné schéma vzniku akrylamidu reakcí redukujících cukrů s asparaginem je na Obrázku č. 4.



1.6.2 Alternativní možnosti vzniku akrylamidu

Mezi prekurzory tvorby akrylamidu v rámci alternativních vedlejších drah patří 3-aminopropionamid, akrolein, kyselina akrylová a kyselina pyrohroznová [37, 48].

- **Prekurzor 3-aminopropionamid (3-APA)**

3-APA byl během tvorby akrylamidu z asparaginu poprvé identifikován jako přechodný meziprodukt. Kromě toho 3-APA může být vytvořen v potravinách enzymatickou dekarboxylací asparaginu, a v reakcích mezi asparaginem a kyselinu pyrohroznovou. Jedná se o velmi účinný prekurzor akrylamidu za určitých reakčních podmínek. Jednou z možností cest vzniku akrylamidu je termicky indukovaná dekarboxylace asparaginu na 3-APA a jeho následná deaminace za vzniku akrylamidu [19, 28, 33, 39].

- **Prekurzor akrolein**

Akrolein (2-propenal), připomínající svojí strukturou akrylamid, je jednoduchý nenasyčený aldehyd. Je známo, že akrolein a kyselina akrylová vzniká dehydratací glycerolu, především při zahřívání živočišných tuků i rostlinných olejů za vysoké teploty. Další možností vzniku je během enzymového i neenzymového maturace v důsledku oxidace lipidů z polynenasycených mastných kyselin. [24, 28, 33, 48].

- **Prekurzor akrylová kyselina**

Prekurzorem tvorby kyseliny akrylové může být kyselina asparagová, karnosin a β -alanin při jejich tepelném rozkladu. Pro konverzi kyseliny akrylové na akrylamid je důležitá přítomnost amoniaku. Vznik akrylamidu z karnosinu byl zaznamenán v ohřívání masa. Karnosin hydrolyzuje na β -alanin, který dále reaguje s amoniakem uvolněným při Streckerově degradaci aminokyselin. Akrylamid se v masných výrobcích nachází v malých koncentracích. Příčinou je jeho okamžitá přeměna na methylové deriváty [28, 33, 37, 48].

- **Kyselina pyrohroznová**

Dehydratací samotného serinu, nebo v přítomnosti cukrů vzniká kyselina pyrohroznová. Po odstranění sulfidové molekuly se na kyselinu pyrohroznovou může generovat také cystein. Z kyseliny pyrohroznové vzniká kyselina mléčná, a dále následnou dehydratací kyselina akrylová. Tvorba akrylové kyseliny byla zjištěna spolu s kyselinou pyrohroznovou při pyrolýze serinu [48].

1.7 Minimalizace akrylamidu v potravinách

Na celosvětové úrovni bylo vynaloženo úsilí k vypracování strategie snižující obsah akrylamidu v rizikových potravinách. Výzkumy byly zaměřeny především na výrobky z brambor, obilovin a později i kávy, jelikož patří do nejvýznamnější skupiny potravin přispívajících k expozici akrylamidu [18].

Pro výrobce potravin vydala organizace FoodDrinkEurope souhrnné informace o možnostech minimalizace akrylamidu v různých typech potravin (bramborovém, cereálním a kávovém odvětví) v podobě příručky *Acrylamide Toolbox 2013* [2, 18, 43].

V uvedené příručce je 14 možných parametrů (nástrojů) ovlivňujících množství akrylamidu v potravinách rozdělených do 4 skupin podle možné úrovně ovlivnění během procesu zpracování:

- **Agronomie** (redukující sacharidy, asparagin)
- **Receptura** (kypřící látky, další vedlejší přísady, pH, zředění prekurzorů a velikost výrobku, přepracování meziproduktů a fermentace)
- **Zpracování** (enzym asparagináza, teplota/čas, obsah vody, předběžná úprava, konečná barva produktu, struktura a chuť)
- **Konečná úprava** (rady spotřebitelům) [14, 43].

V současné době, kdy společnost necpocítuje nedostatek potravin, se do popředí dostává otázka okolo bezpečnosti a kvality potravin. Roste nejen nabídka potravin, ale kontinuálně s ní i stále se zvyšující nároky na kvalitu. Výběr a způsob minimalizace akrylamidu v potravinách je podmíněn spotřebitelem i výrobcem, tedy mnoha faktory – vizuální atraktivnost, požadovaná senzorická charakteristika, vhodný nutriční profil a zdravotní benefit, stabilita během skladování, jednoduchá příprava a v neposlední řadě i nepřítomnost kontaminantů, mikrobiologická bezpečnost, technologická náročnost zpracování aj. [1, 2, 19].

Asparagin a redukující cukry (glukóza a fruktóza) jsou výchozími látkami pro vznik akrylamidu. Hlavní způsoby eliminace vzniku akrylamidu v potravinách jsou následující: snižování obsahu asparaginu nebo redukce sacharidů, zásah do mechanismu eliminací prekurzorů nebo úprava technologického procesu zpracování potravin [15, 19].

1.7.1 Pekárenské a cereální výrobky

Vzhledem k široké škále nejrozličnějších obilovin, receptur, přísad a výrobních postupů používaných ve výrobě neexistuje jednotný způsob jak omezit tvorbu akrylamidu. Např. pšeničné produkty obsahují akrylamidu víc, než rýžové nebo kukuřičné. Ovšem každá obilovina má svoje charakteristické nutriční a chuťové vlastnosti. Mezi rizikové

výrobky z obilnin s vysokým obsahem akrylamidu patří snídaňové cereálie, sušenky, opatky, perníky a chléb [14, 33].

Sacharidové složení surovin se nezdá být relevantní pro tvorbu akrylamidu. Výzkumy potvrzují, že spíše než cukry je klíčovým determinantem akrylamidu u produktů z obilovin asparagin. Bylo zjištěno, že hladiny volného asparaginu mají mnohem větší vliv než hladiny redukujících cukrů v pšenici [14, 37].

Obsah asparaginu se liší v závislosti na druhu obilniny a podmínkách pěstování. Například v pšeničné mouce se rozsah asparaginu pohybuje mezi 69 až 297 mg.kg⁻¹ a žitné mouce je obsah vyšší od 319 do 791mg.kg⁻¹. Výběr obilovin s nízkým obsahem asparaginu může být jednou z možností snížení množství akrylamidu [19, 33, 37].

Zjistilo se, že zvýšená koncentrace asparaginu byla u rostlin pěstovaných na půdě s nedostatečným obsahem síry. Tento deficit je v půdách poměrně častý. Potraviny z pšenice, které byly vypěstovány na půdě s nedostatkem síry, obsahovaly mezi 2600–5200 µg.kg⁻¹ akrylamidu. Naopak potraviny pěstované na půdách s dostatečnou hladinou síry, obsahovaly akrylamidu 600–900 µg.kg⁻¹. Podmínky přípravy byly stejné – byly zahřívány při teplotě 160 °C po dobu 20 minut. Zjistilo se, že rostliny s nedostatečným množstvím síry v půdě jsou vystaveny velkému stresu a neukládají do zrn dostatečné množství proteinů. Místo toho ukládají aminokyseliny včetně asparaginu. Nadměrné množství síry v půdě je však taktéž nežádoucí. Rostliny jsou zakrnělé a není vhodné jejich další zpracování. Vytvoření správné rovnováhy mezi množstvím síry a kvalitní úrodou, množstvím síry a minimalizací akrylamidu a množstvím síry a vhodnými organoleptickými vlastnostmi produktu, je velmi komplikované [14, 22, 29].

Volba surovin s nižším obsahem asparaginu vede k výrobě potravin s nižším množstvím akrylamidu. Pšenice, ječmen a oves produkují výrazně více akrylamidu oproti kukuřici nebo rýži. Také použitím menšího množství celozrnné mouky, otrub a zvýšeného množství endospermu snižuje obsah akrylamidu. Ovšem na úkor snížení nutričních hodnot výrobku a změn organoleptických vlastností. Asparagin se v celozrnné mouce a otrubách vyskytuje ve vyšších koncentracích [14].

Změna kypřicího prostředku je další možností snížení koncentrace akrylamidu. Hydrogenuhlíčan amonný je běžně používanou kypřicí látkou, protože zabezpečuje charakteristický vzhled, texturu a aroma výrobku. Hydrogenuhlíčan amonný ovšem urychluje tvorbu akrylamidu. V současné době se navrhuje úplné nebo alespoň částečné nahrazení hydrogenuhlíčitanu amonného za použití hydrogenuhlíčitanu sodného nebo draselného. Využití těchto kypřících látek ve vzorcích perníku měl vliv na pokles obsahu akrylamidu (z 1200 µg.kg⁻¹ na 70 µg.kg⁻¹). Výsledný produkt se však vyznačoval netypicky světlou barvou a vysokou intenzitou slané chuti. Použití hydrogenuhlíčitanu sodného jako náhrady hydrogenuhlíčitanu amonného zvyšuje množství sodíku

v potravinách. Tato skutečnost je v rozporu se stanovami organizací WHO/FAO, které se snaží zredukovat množství sodíku v přijímané stravě [18, 19, 27].

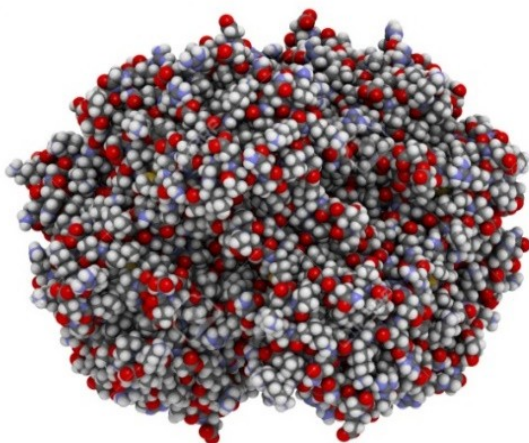
Zvýšená konzumace sodíku je rizikovým faktorem vzniku arteriální hypertenze. Menší příjem sodíku se příznivě projeví i u nemocných s diabetes mellitus 2. typu, u osob středního věku a u pacientů s renálními onemocněními, u nichž systém renin-angiotenzin-aldosteron méně citlivě vyrovnává změny navozené sníženým přísunem soli [4].

Přídavek minoritní látky, která přednostně reaguje se substráty akrylamidu je další z možností snížení jeho koncentrace ve výsledném produktu. Používají se aminokyseliny jako glycin, jednomocné a dvojmocné kationty anorganických solí (především sodných a vápenatých – chlorid sodný, pyrofosfát sodný, dihydrogenfosforečnan sodný nebo draselný). Mechanismus účinku spočívá v zabránění tvorby Schiffovy báze jako meziproduktu Maillardovy reakce a polymeraci již vzniklého akrylamidu. Využití vápenatých solí, resp. vápníku má uplatnění jenom při zpracování chleba a snídaňových cereálií. Při výrobě sucharů a perníků má negativní vliv na organoleptické vlastnosti – barvu, chuť a texturu výsledného produktu [14, 27, 28, 37].

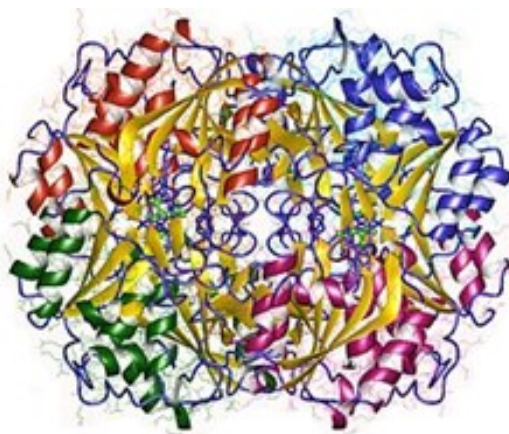
Změna pH přidavkem organických kyselin, např. kyseliny citronové či vinné v koncentraci do 0,5 %, může být další způsob snížení obsahu akrylamidu. Snížením pH prostředí se vytvoří méně vhodné podmínky pro jeho tvorbu. Nevýhodou aplikace je nežádoucí vliv na výslednou barvu a kyselou chuť výrobku. V některých pečárenských produktech může také docházet ke zvýšené tvorbě jiných škodlivých látek, jako je 3-MCPD [18, 27, 28].

Fermentace snižuje hladinu prekursorů akrylamidu a zároveň i pH. Během fermentace těsta dochází vlivem kvasinek ke snižování obsahu redukujících sacharidů i asparaginu. Fermentace s využitím bakterií rodu *Lactobacillus* byla navržena i pro potraviny z brambor, ale v současnosti nelze tuto možnost použít s ohledem na výrobní praxi [14].

Enzym L-asparagináza je jedním z nejslibnějších nástrojů ke snížení obsahu akrylamidu u tepelně zpracovaných potravin. Účinek enzymu je založen na přeměně hlavního prekursoru akrylamidu, aminokyseliny L-asparaginu, na kyselinu L-asparagovou a amoniak. Molekulární a terciární struktura enzymu je vyobrazena na Obrázku č. 5 a 6.



Obrázek č. 5 Molekulární struktura asparaginázy [52]



Obrázek č. 6 Terciární struktura asparaginázy [53]

V modelových systémech bylo dosaženo snížení koncentrace akrylamidu o 85 až 90 %. Enzym našel uplatnění jak u výrobků z obilovin, tak i brambor [18, 24]. Výhodou použití asparaginázy je její minimální vliv na organoleptické vlastnosti (chuť a barvu výsledného produktu). Nevýhodou je její kompatibilita s podmínkami při průmyslovém zpracování, jelikož existuje řada faktorů, které ovlivňují aktivitu tohoto enzymu. Aktivita enzymu je závislá na koncentraci enzymu, době působení, obsahu vody v reakčním prostředí, teplotě a hodnotě pH. Zároveň i vysoké náklady mohou představovat vážné problémy jeho aplikace ve velkém měřítku. Komerčně se vyrábí z *Aspergillus niger* (DSM Preventase) nebo *Aspergillus oryzae* (Novozyme je Acrylaway) [7, 18, 14, 27].

Asparagináza neohrožuje lidské zdraví a má mimo jiné i vysokou terapeutickou hodnotu. Enzym L-asparagináza se využívá při léčbě akutní lymfatické leukémie. Molekulární podstata terapeutického účinku spočívá v degradaci aminokyseliny L-asparagin, která je esenciální pro maligní buňky. Rakovinotvorné buňky nejsou tudíž schopny proteosyntézy a odumírají [24].

Při kombinaci některých z těchto postupů je efekt snížení akrylamidu ještě výraznější. Ovšem některé strategie vedoucí ke snížení obsahu tohoto procesního kontaminantu mohou mít i rizika, příkladem může být prodloužení doby kvašení. Sice účinně sníží koncentraci akrylamidu v chlebu, ale je spojeno se zvýšením hladin 3-MCPD. Dalším příkladem může být zvýšené množství sodíku v potravinách záměnou kypřicího prostředku hydrogenuhličitanu amonného za hydrogenuhličitan sodný [18, 27].

1.7.2 Brambory a výrobky z nich

Složení bramborových hlíz je ovlivněno mnoha faktory: odrůdou, hnojením a typem půdy, klimatickými podmínkami, agrotechnikou, stupněm zralosti při sklizni, podmínkami skladování aj. Z hlediska snížení obsahu akrylamidu se doporučuje výběr

kultivarů s nízkým obsahem sacharidů, dále dodržování technologických podmínek při sběru, skladování a zpracování brambor [14, 19, 28, 37].

Regulací **obsahu redukujících cukrů** v bramborách se zásadně ovlivní tvorba akrylamidu – obsah sacharidů v hlízách koreluje s koncentrací akrylamidu ve výsledném produktu. Při zpracování se doporučuje výběr kultivarů s nízkým obsahem sacharidů a se správným poměrem glukózy a fruktózy vhodným pro daný typ úpravy [14, 19, 37].

Agonomickým zásahem lze přispět k minimalizaci rizik vysokého obsahu redukujících cukrů pěstováním – výběrem odrůd, které jsou nejvhodnější pro místní podmínky růstu, vhodnou volbou terénu a dodržováním osvědčených agonomických postupů. Důležité je **sklizení** pouze zralých hlíz, nezralé hlízy mají vyšší obsah redukujících cukrů. Regulovat sacharidy lze i **teplotou skladování**. Je známo, že při dlouhodobějším skladování za teploty pod 4 °C vzrůstá díky hydrolýze škrobu obsah redukujících cukrů i sacharidů a tím dochází ke zvýšené potenciální tvorbě akrylamidu [14, 15, 37].

Obsah asparaginu v bramborách je vysoký (93,6 mg/100 g), ale jeho koncentrace je relativně konstantní. V USA byly testovány nové odrůdy geneticky modifikovaných brambor, u nichž byly potlačeny geny pro syntézu asparaginu. Obsah volného asparaginu byl až pětinasobně snížený. Tepelně zpracované produkty z těchto hlíz vykazují srovnatelné senzorické vlastnosti s geneticky neupravenými bramborami a očekávaně nižší hladiny akrylamidu až o 50–75 %. Tyto brambory jsou schváleny pro pěstování v USA od roku 2016. Jsou odolné proti plísni bramborové, údržnější pro skladování a manipulaci a zároveň se sníženým obsahem redukujících cukrů [14, 37, 47].

Při zpracování může být dalším technologickým krokem k odstranění asparaginu a sacharidů **blanšírování** a **promývání** brambor v teplé nebo studené vodě. Důležitou roli hraje i **tepelná úprava**. Tvorba akrylamidu začíná při teplotě nad 100 °C a s rostoucí teplotou v rozmezí 120–210 °C se zvyšuje [19, 37].

Výrobky z brambor jsou upravené technologickým procesem, zejména loupáním, konzervací, smažením, vařením, drcením a sušením pro přímou spotřebu nebo další kuchyňskou úpravu. Primární strategií ke snížení akrylamidu v bramborových výrobcích je snížení množství aminokyseliny asparaginu a redukujících cukrů – viz výše [14, 19].

V bramborových lupíncích závisí obsah akrylamidu i na teplotě a době tepelné úpravy. Obsah cukrů by měl být menší než 0,3 %. Nepoužívají se brambory skladované při teplotě menší jak 6 °C. Při výrobě se preferují čerstvé brambory oproti déle skladovaným. Bramborové plátky je ke snížení sacharidů nutno promývat vodou. Bere se v potaz teplota, doba smažení a jiná nastavení, aby měl výsledný produkt zlato-žlutou barvu [14, 19, 37].

U smažených bramborových výrobků jsou podmínky obdobné. Důležité je vybrat vhodný kultivar a kontrolovat skladovací teplotu. Brambory se doporučuje blanširovat

ve vodě a v posledním stádiu blanširování přidat pyrofosfát sodný, který sníží obsah akrylamidu v konečném produktu [14, 19].

Při ochlazení brambor pod 10 °C se zvyšuje obsah redukujících cukrů, což má za následek zvýšení koncentrace akrylamidu v smažených nebo pečených bramborových výrobcích [14, 37].

1.7.3 Káva a kávové náhražky

Obsah akrylamidu v kávě závisí na mnoha faktorech. Výrazně se uplatňuje druh kávy, šarže, podmínky pražení, doba a podmínky skladování, v neposlední řadě i příprava kávového nápoje. U rozpustné kávy jsou důležité i podmínky extrakce a sušení. Káva se obvykle praží při teplotách v rozmezí 220–250 °C. Doba a rychlost pražení hrají zásadní roli v sensorických vlastnostech kávy, jako jsou barva, vůně a chuť [9, 19].

U pražených a instantních káv by neměly hladiny akrylamidu přesáhnout 450 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ a 900 $\mu\text{g.kg}^{-1}$, v uvedeném pořadí. Vyšší hodnota u káv instantních vyplývá z výrobní technologie instantní kávy, kdy dochází k extrakci látek z pražené kávy za vysoké teploty 175 °C a poté sušení ve vyhřívaných systémech při 200 až 300 °C. Tyto vysoké teploty představují vhodné podmínky pro další nárůst akrylamidu v instantní kávě. Mimo to, instantní káva je silný koncentrát kávy pražené, což může způsobovat vyšší hladiny tohoto procesního kontaminantu [9, 10, 43].

V pražené zrnkové kávě je průměrně 170–351 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ akrylamidu. Při porovnání dvou typů káv, Robusty a Arabicy, je vyšší obsah akrylamidu v kávě typu Robusta z důvodu vyšší koncentrace volného asparaginu. Akrylamid se tvoří na začátku procesu pražení. Při vyšší teplotě a době působení jeho obsah klesá. Silně pražené kávy mají tudíž obsah akrylamidu nižší (5 $\mu\text{g.dm}^{-3}$ výluhu) oproti středně nebo slabě pražené (cca 10 $\mu\text{g.dm}^{-3}$ výluhu), na rozdíl od jiných tepelně upravovaných potravin. Tento efekt souvisí s eliminačními reakcemi na konci deštruktivního pražení kávy při vyšších teplotách [9, 14, 19].

Možnosti snížení obsahu akrylamidu v kávě jsou omezené. Jednak proto, že v kávových zrnech je množství asparaginu jen v rozsahu 30–90 μg na 100 mg, dále kvůli nezávislosti obsahu akrylamidu na koncentraci sacharidů v zelených zrnech a taktéž kvůli specifickému procesu zpracování kávy, při kterém již nepatrná změna ovlivňuje sensorické vlastnosti i kvalitu výsledného produktu. Zajímavostí může být, že při skladování kávy při běžné pokojové teplotě dochází ke ztrátám akrylamidu o 40–60 %. Žádné účinné metody snížení akrylamidu v pražené kávě dosud nebyly prezentovány [9, 19].

Káva a náhražky kávy jsou skupinami potravin, u kterých podstatné snížení obsahu akrylamidu vede ke změně sensorických a organoleptických vlastností i celkovému snížení kvality a bezpečnosti výsledného produktu [9, 14].

1.8 Legislativa

Vyhláška Ministerstva zdravotnictví č. 38/2001 Sb., o hygienických požadavcích na výrobky určené pro styk s potravinami a pokrmu, ve znění pozdějších předpisů, upravuje množství monomerního akrylamidu migrujícího z obalových materiálů, které přicházejí do kontaktu s potravinami. Tato vyhláška předepisuje, že z obalového materiálu nesmí do potravin migrovat větší množství akrylamidu, než $0,01 \text{ mg.kg}^{-1}$ [44].

V případě přítomnosti akrylamidu v pitné vodě musí jeho obsah dodržet limity dané vyhláškou Ministerstva zdravotnictví č. 252/2004 Sb., ve znění pozdějších předpisů, která stanovuje hygienické požadavky na pitnou a teplou vodu, četnost a rozsah kontroly pitné vody. V tomto právním předpisu činí nejvyšší mezní hodnota akrylamidu na $0,1 \text{ } \mu\text{g.dm}^{-3}$ pitné vody [45].

V České republice jsou hodnoty akrylamidu v potravinách kontrolovány Státní zemědělskou a potravinářskou inspekcí (SZPI). Nejvyšší přípustný obsah akrylamidu v potravinách není prozatím legislativou stanoven. Evropská komise vydala tzv. *směrné hodnoty* akrylamidu, nejedná se tedy o bezpečnostní limit, ale jde pouze o doporučené hodnoty. Množství akrylamidu v potravinách bylo monitorováno členskými státy v letech 2007–2009 podle doporučení Komise 2007/331/ES a od roku 2010 podle doporučení Komise 2010/307/EU. Členské státy ověřovaly přítomnost akrylamidu u potravin obsahujících vysoká množství akrylamidu a potravin, které výrazně přispívají k dietárnímu příjmu člověka. Podle doporučení Komise 2010/307/ES byl monitorován obsah akrylamidu ve skupině pekařských výrobků (chléb, sušenky, perníky, extrudované snídaňové cereálie a krekrové pečivo), v bramborových lupíncích a mleté pražené kávě [2, 34, 41, 42].

Nejnovější doporučení Komise 2013/647/EU pochází ze dne 8. listopadu 2013 viz. Tabulka č. 5. Poslední doporučení Komise vyzývá členské státy, aby s aktivní účastí provozovatelů potravinářských podniků prováděli další zkoumání metod výroby a zpracování potravin s obsahem akrylamidu. Dokument stanovuje směrné hodnoty akrylamidu na základě údajů EFSA z monitorování v letech 2007–2012 [43].

Tabulka č. 5 Doporučené směrné hodnoty akrylamidu (2013/647/EU) [43]

Potravina	Směrná hodnota ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)
Hranolky k přímé spotřebě	600
Bramborové lupínky z čerstvých brambor a z bramborového těsta	1 000
Bramborové kreky	
Měkký chléb	
a) Pšeničný chléb	80
b) Měkký chléb jiný než pšeničný chléb	150
Snídaňové cereálie (kromě ovesné kaše)	
výrobky z otrub a celozrnné cereálie, pufované zrní (vztahuje se na pufované, pouze pokud je vyznačeno)	400
pšeničné a žitné výrobky (*)	300
výrobky z kukuřice, ovesa, pšenice špaldy, ječmene a rýže (*)	200
Sušenky a oplatky	500
Krekry s výjimkou bramborových krekrů	500
Křupavý chléb	450
Perník	1 000
Výrobky podobné ostatním výrobkům této kategorie	500
Pražená káva	450
Instantní (rozpustná) káva	900
Náhražky kávy	
a) převážně obilné náhražky kávy	2 000
b) jiné náhražky kávy	4 000
Příkrmy pro kojence jiné než obilné příkrmy (**)	
a) bez švestek	50
b) se švestkami	80
Sušenky a suchary pro kojence a malé děti	200
Obilné příkrmy pro kojence a malé děti (***), kromě sušenek a sucharů	50

(*) Jiné než celozrnné cereálie a/nebo jiné než otrubové cereálie. Obilovina přítomná v největším množství určuje kategorii.

(**) Podle ustanovení čl. 1 odst. 2 písm. b) směrnice Komise 2006/125/ES ze dne 5. prosince 2006 o obilných a ostatních příkrmech pro kojence a malé děti (Úř. věst. L 339, 6. 12. 2006, s. 16).

(***) Podle ustanovení čl. 1 odst. 2 písm. a) směrnice 2006/125/ES.

1.9 Metody analýzy akrylamidu v potravinách

Po roce 2002 byly navrženy různé analytické metody, které by byly schopny detekovat i nízké hladiny akrylamidu v rozličných typech matric – ve vodě, biologických materiálech i tepelně upravených potravinách [8, 21].

Stanovení koncentrace akrylamidu v potravinách není jednoduché. Komplikace jsou způsobeny v důsledku matric, které obsahují i rušivé složky znesnadňující analýzu. Analýzu sťažuje i nízká molekulová hustota akrylamidu, jeho vysoká polarita, velmi dobrá rozpustnost ve vodě, vysoká reaktivita a malá těkavost. Obsah akrylamidu bývá také často v analyzovaných vzorcích nízký [11, 21].

V závislosti na typu matrice jsou metody založené na různých způsobech a podmínkách extrakce, odstranění tuku z matrice, přečištění a zakoncentrování. Akrylamid se netvoří rovnoměrně v celém vzorku (např. na povrchu pečiva), proto se vyskytují rozdíly v jeho obsahu v jednotlivých vzorcích. Z tohoto důvodu je důkladná homogenizace vzorku velmi důležitým krokem [21, 39].

Mezi hlavní metody analýzy akrylamidu v potravinách patří plynová chromatografie s hmotnostním detektorem (GC/MS) a vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) s hmotnostní spektrometrií (LC/MS/MS), které jsou založené na homogenizaci vzorku, přidání standardu akrylamidu, extrakci, přečištění vzorku, derivatizaci a následném vlastním stanovení s detekcí pomocí hmotnostní spektrometrie. Tyto metody se používají pro širokou škálu potravin. Nevýhodou je delší doba přípravy (při derivatizaci vzorku) a drahá instrumentace. Dalším typem separační techniky může být kapilární elektroforéza (CE) a enzymatické metody typu ELISA. Možností stanovení akrylamidu je i voltametrická metoda, ovšem tato metoda je stále ve vývoji. Výhodou oproti chromatografickým metodám je rychlost a nižší náklady na instrumentaci i provoz. V současnosti stále probíhají intenzivní výzkumy jednotlivých metod stanovení. Diskutována je i možnost tvorby akrylamidu z prekursorů během přípravy analytu či možnost kontaminace z materiálů které se používají k analýze. Důležitou snahou je nastavení podmínek pro nejnižší meze detekce [2, 3, 21, 34].

Podle doporučení Komise ze dne 2. června 2010 by měly analytické metody dosáhnout tzv. *meze stanovitelnosti* (LOQ). Tato hodnota je pro chléb a potraviny určené kojencům a dětem rovna $30 \mu\text{g.kg}^{-1}$ a pro výrobky z brambor, ostatní výrobky z obilovin, kávu a ostatní produkty rovna $50 \mu\text{g.kg}^{-1}$ [8, 30].

1.9.1 Kapalinová chromatografie

Chromatografie patří k nejvýznamnějším analytickým metodám. Umožňuje dělení, identifikaci a stanovení mnoha organických i anorganických látek. V kapalinové chromatografii je mobilní fází kapalina, buďto ve formě čistého rozpouštědla, nebo směsi mísitelných rozpouštědel. Používají se směsi polárnějšího a méně polárního rozpouštědla

(př. methanol a voda). Rovnováhu mezi analytem a stacionární fází (a tím i retenční vlastnosti analytu) ovlivňuje polarita mobilní fáze. Stacionární fáze a její vlastnosti jako jsou polarita nebo ionizovatelnost, se liší podle mechanismu separace [6, 16].

Během separace se analyt rozděluje mezi fázi stacionární a mobilní. Doba, jakou stráví v jedné či druhé fázi, závisí na afinitě analytu ke každé z nich. Jsou zde použity různé mechanismy separace – adsorpce, rozdělování na základě různé rozpustnosti, iontová výměna, molekulově síťový efekt nebo specifické interakce v afinitní chromatografii. Kapalinová chromatografie je vhodná pro separaci i tepelně nestálých a netěkavých sloučenin [6, 16].

V současné době pro kvantitativní měření akrylamidu v potravinách patří mezi nejrozšířenější techniky metoda LC/MS/MS z důvodu vysoké citlivosti, selektivity, jednoduchosti. Zároveň je zde vynechán krok časově náročné derivatizace, která je nutná pro plynovou chromatografii. LC/MS metody jsou považovány za jednodušší a méně časově náročné. Hlavní nevýhodou při stanovení jsou potenciální interference způsobené maticí, zejména pro potraviny, jako je kakao a káva [28, 39].

Stanovení akrylamidu metodou HPLC/MS zahrnuje extrakci vodou, přečištění pomocí SPE kolonek a analýzu na hmotnostním spektrometru v modulu ESI+. Pro HPLC/MS je mez stanovitelnosti od 30 do 50 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ a pro LC/MS/MS od 4 do 30 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ [21, 30, 36].

1.9.2 Plynová chromatografie

Plynová chromatografie se používá k separaci plynů, většiny nedisociovatelných kapalin a pevných organických molekul a organokovových látek. Mobilní fází je zde nosný plyn. Vzorek je dávkován do proudu plynu, který jej unáší dále kolonou. Jednotlivé složky se v koloně separují na principu různé schopnosti poutat se na stacionární fázi. Nutností vzorku je jeho přeměna na plyn, separovaná látka musí mít dostatečný tlak syté páry, být tepelně stálá a mít relativní molekulovou hmotnost menší než 1000. Potřebným a častým postupem bývá derivatizace analytu [6, 16].

Vzhledem k nízké těkavosti a polaritě akrylamidu je většina metod GC/MS založena na derivatizaci akrylamidu bromací. Tímto krokem vznikne těkavější a méně polárnější produkt. Výsledný derivát je snáze extrahován a může být lépe detekován metodou GC. Konverze akrylamidu na 2,3-dibrompropenamid je provedena přidáním bezvodého bromidu draselného, kyseliny bromovodíkové a nasyceným roztokem bromové vody. Následnou reakcí s triethylaminem je možné získat stabilnější derivát 2-brompropenamid a ten poté stanovit pomocí GC/ECD nebo GC/FID [28, 36]. Akrylamid lze stanovit i bez bromace, ovšem jen při vyšších koncentracích v matici. Pro GC/MS je mez stanovitelnosti od 4 až do 30 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ [30, 36].

2 PRAKTICKÁ ČÁST

Principem metody je extrakce vzorku vodou, následné odstředění a přečištění supernatantu pomocí dvou SPE kolonek (extrakce tuhou fází) a zakoncentrování akrylamidu. Eluace vzorku probíhá směsí metanol-voda. Po odpaření methanolu je extrakt analyzován metodou HPLC s MS/MS detekcí. Identifikace se uskutečňuje na základě srovnání retenčních časů, poměru molekulových iontů a jejich fragmentů ve vzorku a standardu, kvantifikace byla provedena pomocí vnitřního standardu.

2.1 Použitá metoda analýzy, přístroje a zařízení

- Kapalinový chromatogram s MS/MS detektorem (AB Sciex Triple Quad 5500)
- Analytická kolona Hypercarb 5 μ m, 50 x 2,1 mm s předkolonkou 5 μ m, 10 x 2,1mm
- Laboratorní homogenizátor Grindomix GM 200 (Retsch)
- Analytické váhy Mettler Toledo AT261
- Předvážky Mettler Toledo PB303
- Třepačka Certomat
- Chlazená odstředivka IEC CL31R Multispeed centrifuge (Thermo Electron Corporation)
- Kalibrované elektronické pipety (Biohit)
- Termovap (Ecom s.r.o.)
- SPE kolonky Isolute Multimode, 1000 mg/6ml (International Sorbent Technology)
- SPE kolonky Isolute ENV+, 500 mg/6ml (International Sorbent Technology)
- Přístroj na přípravu deionizované vody (Millipore Simplicity 185)



Obrázek č. 7 Kapalinový chromatograf QTRAP 5500 [vlastní zdroj]

2.2 Chemikálie

- Methanol (CH_3OH), AppliChem
- Deionizovaná voda
- Kyselina octová-ledová, Merck
- Standard akrylamidu, Fluka
- Akrylamid- d_3 , Sigma - Aldrich
- Mobilní fáze: 0,1% kyselina octová ve vodě
- Eluční roztok ENV+: methanol/voda (60+40)

2.3 LC/MS/MS podmínky pro stanovení

K měření byl využit kapalinový chromatograf s MS/MS detektorem (AB Sciex Triple Quad 4500). Byla použita analytická kolona Hypercarb $5\ \mu\text{m}$, $50 \times 2,1\ \text{mm}$ s předkolonkou $5\ \mu\text{m}$, $10 \times 2,1\ \text{mm}$. Další podmínky pro stanovení: velikost částic $5\ \mu\text{m}$, mobilní fáze 0,1% kyselina octová ve vodě, teplota $25\ ^\circ\text{C}$, průtok $0,4\ \text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$, nástřik $10\ \mu\text{l}$. Podmínky pro MS/MS detekci: ionization mode ESI+, curtain gas 24, collision gas 8, ion spray voltage 5500, temperatur $400\ ^\circ\text{C}$, ion source gas 1–30, ion source gas 2–20.

2.4 Použitý software

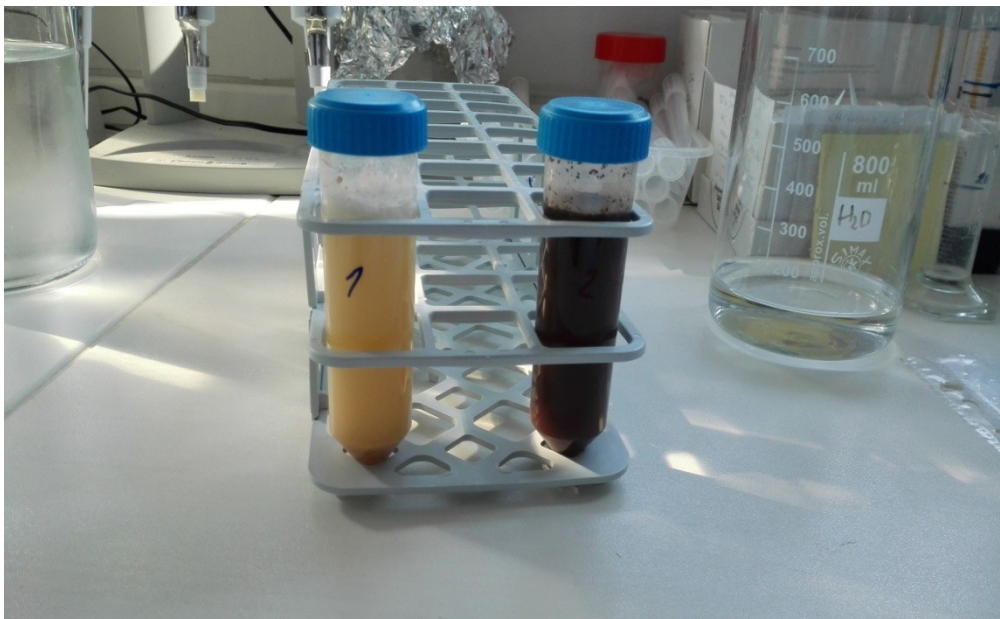
Textová část bakalářské práce byla vypracovaná pomocí programu Microsoft Office Word 2007, tabulky a výpočty byly prováděny programem Microsoft Office Excel 2007. Chromatogramy byly vyhodnocovány za použití programu Analyst 1.6.1 (AB Sciex).

2.5 Analyzované vzorky

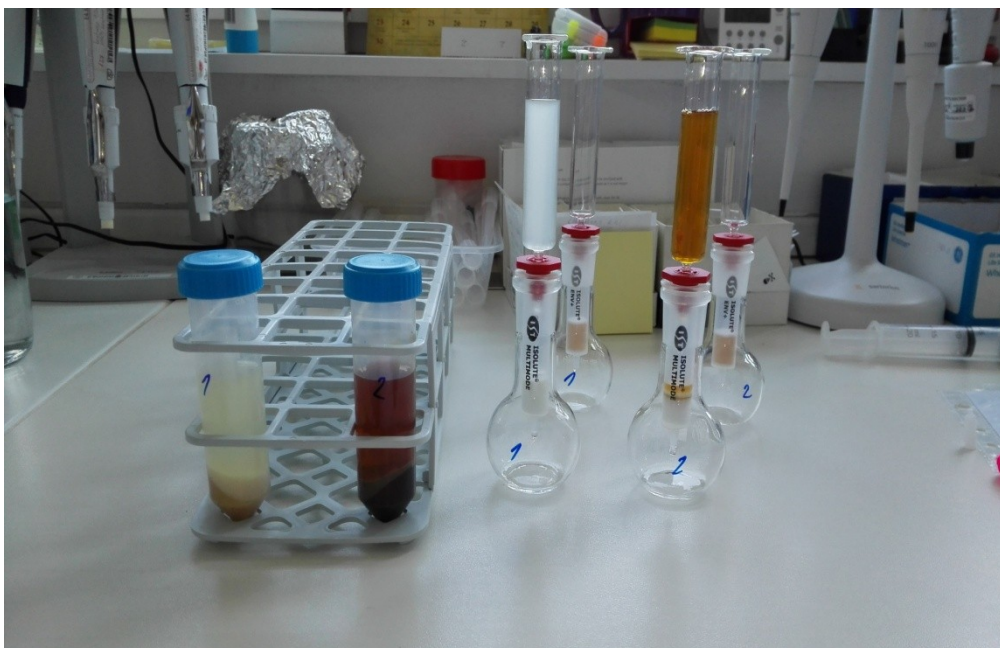
Obsah akrylamidu byl stanovován v 42 vzorcích potravin rozdělených do jednotlivých skupin podle složení matrice. Spektrum analyzovaných vzorků bylo následující: 8x bramborové lupínky, 2x sušenky, 8x popcorn, 9x kukuřičné lupínky, 10x extrudované snídaňové cereálie pro děti a 5x zapékané müsli. Analyzované vzorky pocházely z tržní sítě běžných prodejen v České republice.

2.6 Příprava vzorků

K pomletému vzorku 2 g bylo přidáno 40 μ l vnitřního standardu (akrylamid- d_3) a 40 ml deionizované vody. Po šedesátiminutovém třepání byl homogenát kvantitativně převeden do polypropylenové centrifugační zkumavky a odstředěn při teplotě 10 °C a 3000 otáčkách po dobu 20 minut. Kolonky Multimode a ENV+ byly předem aktivovány dle návodu metanolem a následně vodou. K přečištění bylo odebráno 10 ml supernatantu, který se nechal volně prokat přes kolonku Multimode. Veškerý eluát z kolonky byl následně nanesen na kolonku ENV+. Kolonka po nanesení vzorku byla promyta vodou a vysušena vzduchem. Akrylamid byl z kolonky eluován 2 ml směsí methanol/voda (60:40) a zakoncentrován odpařením methanolu pod proudem dusíku při teplotě 40 °C. Odparek o objemu přibližně 500 μ l byl převeden do skleněné vialky a analyzován na LC/MS/MS. Pro kvantifikaci akrylamidu ve vzorcích byly připraveny kalibrační standardy o koncentracích 0, 5, 10, 50, 100, 500, 1000, 2000 a 5000 μ g.dm⁻³.



Obrázek č. 8 Příprava vzorku (homogenizát) [vlastní zdroj]



Obrázek č. 9 Příprava vzorku (přečištění SPE) [vlastní zdroj]

2.7 Výsledky a diskuze

Předmětem laboratorní části práce byla analýza některých potravin bohatých na akrylamid. Vybrané vzorky byly připraveny a měřeny v nejmenované akreditované laboratoři (pracoviště si přálo zůstat v anonymitě, proto i značky jednotlivých výrobků nebudou v práci jmenovány). Připravené vzorky byly analyzovány na kapalinovém chromatografu s tandemovou hmotnostní detekcí. Kvantifikace byla provedena pomocí lineární kalibrační křivky, která byla v rozmezí $0\text{--}5000\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$. Pro spolehlivost a dosažení maximální selektivnosti byl použit vnitřní standard izotopicky značený Akrylamid- d_3 . Směrodatná odchylka byla stanovena na 2,2 %. Mez detekce byla $3\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ a mez stanovitelnosti $10\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$.

Legislativou není dosud stanoven nejvyšší přípustný obsah akrylamidu v potravinách. Evropskou komisí byly vydány pouze doporučené hodnoty, tzv. „*směrné hodnoty*“ akrylamidu v potravinách (doporučení Komise 2013/647/EU). Doporučení Evropské komise č. 2013/647/EU je uvedeno v kapitole 1.8 Legislativa.

Obsah akrylamidu byl stanovován v 42 vzorcích potravin rozdělených do jednotlivých skupin podle složení matrice. Výrobky bylo možné zakoupit běžně v i tržní síti České republiky. Celkem 95 % analyzovaných vzorků bylo pozitivní na přítomnost akrylamidu. Přítomnost nebyla potvrzena pouze u dvou vzorků extrudovaných snídaňových cereálií pro děti. Koncentrace tohoto procesního kontaminantu se pohybovala od minimální hodnoty $50\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ až po $1550\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$.

Uvedenou metodou byly analyzovány následující vzorky – 8x bramborové lupínky, 2x sušenky, 8x kukuřičný popcorn, 9x kukuřičné lupínky, 10x extrudované snídaňové cereálie pro děti a 5x zapékané müsli. Koncentrace akrylamidu v jednotlivých vzorcích shrnuje Tabulka č. 6 a Graf č. 1.

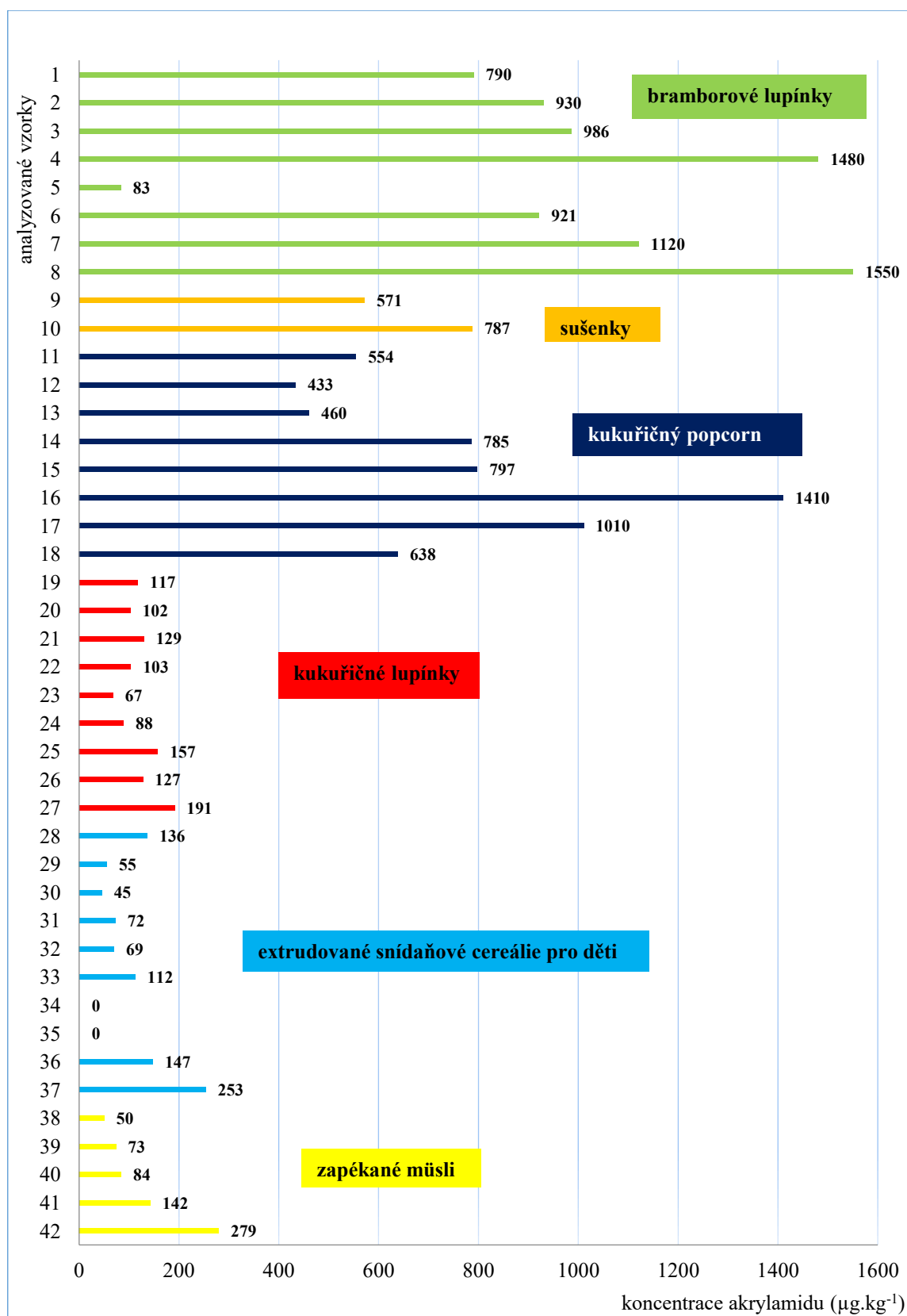
Tabulka č. 6 Koncentrace akrylamidu v analyzovaných vzorcích ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)

Potravinová matrice	Analyzované vzorky	Koncentrace akrylamidu	Průměrná hodnota	Maximální hodnota	Minimální hodnota
Bramborové lupínky	1*	790	982	1550	83
	2	930			
	3*	986			
	4*	1480			
	5*	83			
	6	921			
	7	1120			
	8	1550			
Sušenky	9	571	679	787	571
	10	787			
Kukuřičný popcorn	11	554	761	1410	433
	12	433			
	13	460			
	14	785			
	15	797			
	16	1410			
	17	1010			
	18	638			
Kukuřičné lupínky	19**	117	115	191	50
	20**	102			
	21**	129			
	22**	103			
	23	50			
	24	55			
	25	157			
	26	127			
	27	191			
Extrudované snídaňové cereálie pro děti	28	136	89	253	0
	29	55			
	30	45			
	31	72			
	32	69			
	33	112			
	34	0			
	35	0			
	36	147			
	37	253			
Zapékané müsli	38	50	126	279	50
	39	73			
	40	84			
	41	142			
	42	279			

* Vzorky bramborových lupínků: stejný výrobce, různé šarže

** Vzorky kukuřičných lupínků: stejný výrobce, různé šarže

Graf č. 1 Koncentrace akrylamidu v analyzovaných vzorcích ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)



Shrnutí výsledků obsahu akrylamidu v analyzovaných vzorcích udává Tabulka č. 7.

Tabulka č. 7 Obsah akrylamidu v jednotlivých komoditách ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)

Komodita	Počet vzorků	Minimální – maximální hodnota akrylamidu	Průměrná hodnota akrylamidu
Bramborové lupínky	8	83–1550	982
Sušenky	2	571–787	679
Kukuřičný popcorn	8	433–1410	761
Kukuřičné lupínky	9	50–191	115
Extrudované snídaňové cereálie pro děti	10	0–253	89
Zapékané müsli	5	50–279	126
Celkem	42	-	-

První měřenou skupinou byly bramborové lupínky. Z bramborových lupínků bylo analyzováno celkem 8 vzorků, u 3 vzorků byly zaznamenány vyšší hodnoty než je doporučená směrná hodnota (1120, 1480 a 1550 $\mu\text{g.kg}^{-1}$). V bramborových lupíncích dosahoval akrylamid vyšších koncentrací od 83 do 1550 $\mu\text{g.kg}^{-1}$, což odpovídá výsledkům kontrolních měření uskutečněných SZPI v letech od 2003–2014. Doporučení Komise č. 2013/647/EU udává směrné hodnoty akrylamidu v bramborových lupíncích z čerstvých brambor a z bramborového těsta 1000 $\mu\text{g.kg}^{-1}$.

Druhou měřenou skupinou byly sušenky. Hodnoty koncentrace akrylamidu převyšovaly nad doporučením Evropské komise č. 2013/647/EU. Ta směrnou hodnotu akrylamidu stanovuje na 500 $\mu\text{g.kg}^{-1}$. Koncentrace akrylamidu ve 2 vzorcích sušenek byla následující: 571 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ a 787 $\mu\text{g.kg}^{-1}$.

Z kukuřičných výrobků byly měřeny kukuřičný popcorn a kukuřičné lupínky, tzv. cornflakes. Průměrná hodnota akrylamidu v popcornu byla 761 $\mu\text{g.kg}^{-1}$. Minimální naměřená hodnota akrylamidu byla 433 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ a maximální hodnota dosahovala čísla 1410 $\mu\text{g.kg}^{-1}$. Doporučená hodnota Evropské komise č. 2013/647/EU pro pufované zrní je 400 $\mu\text{g.kg}^{-1}$. Bylo analyzováno 8 vzorků kukuřičného popcornu, z toho 6 vzorků převyšovalo doporučené hodnoty stanovené Komisí – 554, 785, 638, 797, 1010 a 1410 $\mu\text{g.kg}^{-1}$.

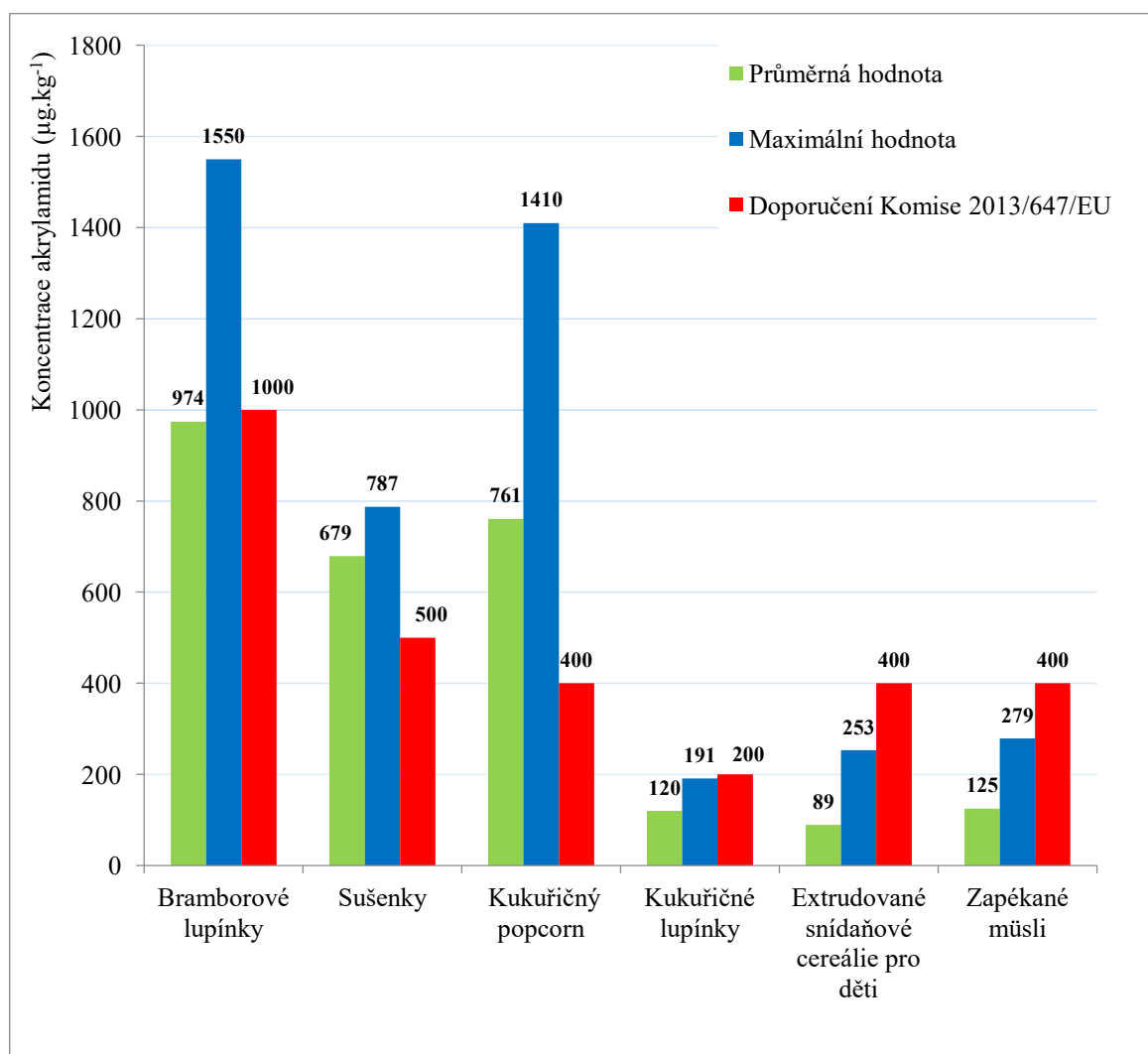
Obsah akrylamidu v kukuřičných lupíncích se pohyboval v intervalu 50–191 $\mu\text{g.kg}^{-1}$. Doporučená hodnota Evropské komise č. 2013/647/EU ve snídaňových cereáliích (výrobky z kukuřice) je 200 $\mu\text{g.kg}^{-1}$. Z 9 analyzovaných vzorků kukuřičných lupínků všechny splnily doporučenou hodnotu.

Z cereálních výrobků byly analyzovány extrudované snídaňové cereálie určené pro děti (cereální čokoládové kuličky, kroužky, taštičky...). Bylo měřeno 10 výrobků, z toho

bylo 8 vzorků s pozitivním nálezem a 2 vzorky bez nálezu akrylamidu. Naměřené hodnoty se pohybovaly v rozmezí 0–253 $\mu\text{g.kg}^{-1}$. Doporučení Evropské komise č. 2013/647/EU, které udává směrné hodnoty akrylamidu ve snídaňových cereáliích 400 $\mu\text{g.kg}^{-1}$, bylo splněno.

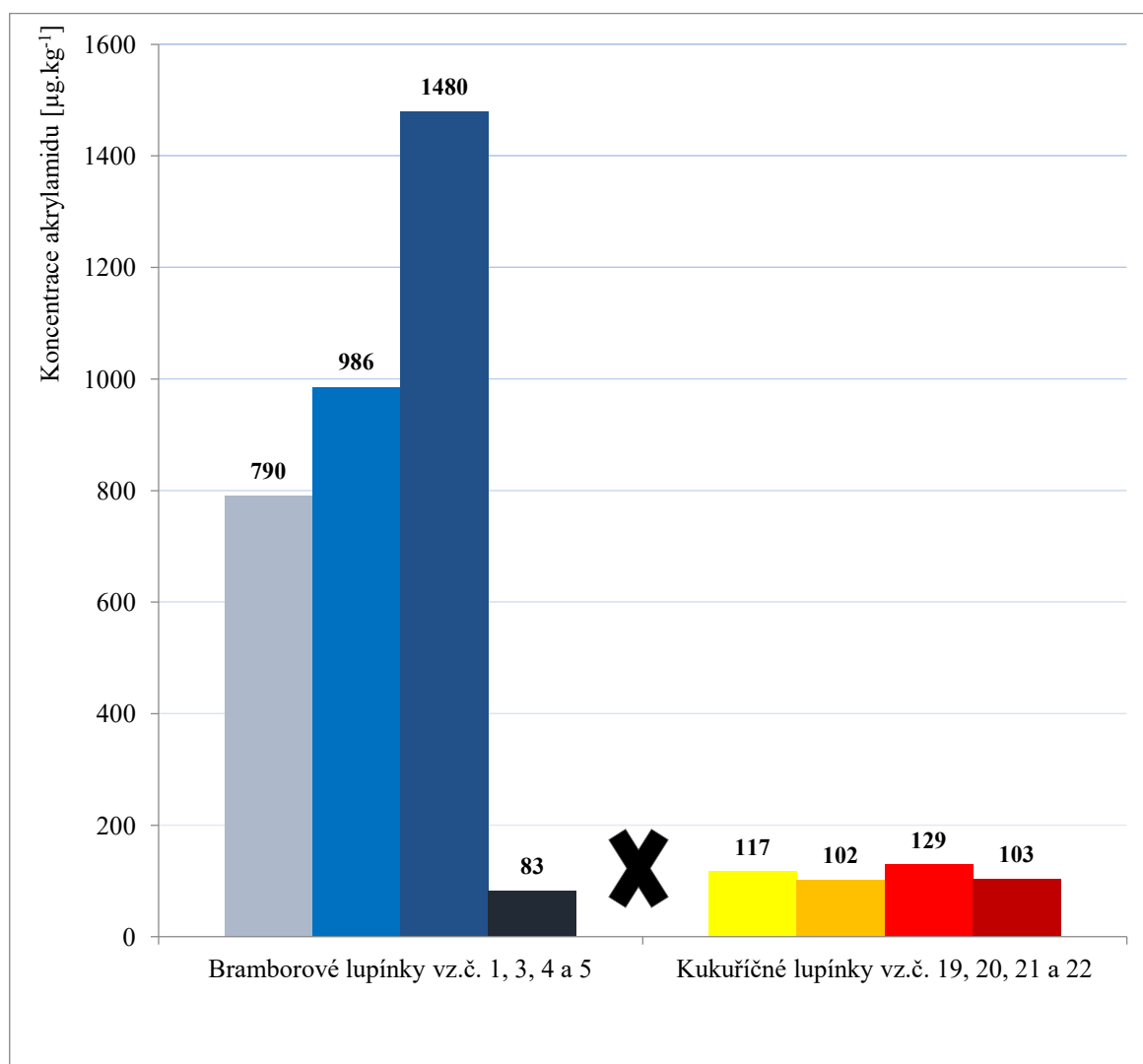
Poslední skupinou analyzovaných výrobků byly zapékané müsli cereálie. Obsah akrylamidu v zapékaných müsli cereáliích se pohyboval v rozmezí 50–279 $\mu\text{g.kg}^{-1}$. Koncentrace akrylamidu ve všech produktech splňovala doporučení Evropské komise č. 2013/647/EU, které udává směrné hodnoty akrylamidu ve snídaňových cereáliích (výrobky z otrub a celozrnných cereálií) 400 $\mu\text{g.kg}^{-1}$. Pro přehlednost Graf č. 2 shrnuje průměrnou a maximální naměřenou hodnotu akrylamidu v jednotlivých komoditách se doporučenou směrnou hodnotou Komise č. 2013/647/EU.

Graf č. 2 Porovnání hodnot akrylamidu ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)



Hladiny akrylamidu u komerčně dostupných potravin se do značné míry liší nejen mezi jednotlivými značkami ale i mezi výrobními šaržemi konkrétního výrobku. Analýza ve 4 vzorcích bramborových lupínků – vzorky č. 1, 3, 4, 5 (stejný výrobce, různé šarže) vykazovala významné rozdíly v koncentracích akrylamidu 790, 986, 1480 a 83 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ v daném pořadí. Nejvyšší a nejnižší hodnota se od sebe lišily o více jak 1000 $\mu\text{g.kg}^{-1}$. Tyto kolísající hodnoty by se daly vysvětlit tím, že technologické podmínky (teplota, doba přípravy, druh oleje na smažení, skladování aj.) se mohly lišit nebo mohlo dojít ke změně v kvalitě surovin. Naopak analýza 5 kukuřičných lupínků – vzorky č. 19, 20, 21, a 22 (stejný výrobce, různé šarže) vykazovala hodnoty relativně podobné 117, 102, 129 a 103 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ (Tabulka č. 6, Graf č. 3).

Graf č. 3 Porovnání hladin akrylamidu u stejných výrobků různých šarží [$\mu\text{g.kg}^{-1}$]



3 ZÁVĚR

Cílem práce bylo poskytnout základní souhrn informací o akrylamidu – fyzikální a chemické vlastnosti, průmyslové využití, toxicita, vznik a výskytu v potravinách, eliminace a v neposlední řadě možnosti jeho analytického stanovení.

Akrylamid se od 20. století hojně používá v chemicko-technologickém průmyslu. Akrylamid byl na základě studií zařazen do skupiny 2A jako pravděpodobný lidský karcinogen. Je známo, že je akrylamid neurotoxický, karcinogenní, genotoxický, reprodukčně toxický u zvířat a neurotoxický pro člověka. Roku 2002 byla zjištěna jeho přítomnost v potravinách bohatých na sacharidy, které byly vystaveny vysokým teplotám při smažení, pečení, grilování či pražení. Mezi nejvýznamnější rizikové potraviny s přihlédnutím na stravovací nároky patří bramborové a cereální výrobky – bramborové lupínky, hranolky, pečené brambory, pražené snídaňové cereálie, chléb, sušenky, perníky, kreky a oplatky; dále káva a kávovinové náhražky. Zpráva z výboru JEFSA z února 2005 uvádí, že průměrný příjem akrylamidu v celé populaci se odhaduje na $1 \mu\text{g.kg}^{-1}$ tělesné hmotnosti a pro konzumenty s vysokým příjmem (včetně dětí a mládeže) asi $4 \mu\text{g.kg}^{-1}$ tělesné hmotnosti.

V laboratorní části byl obsah akrylamidu v potravinách stanoven kapalinovou chromatografií s hmotnostní detekcí (LC/MS/MS). Obsah akrylamidu byl sledován ve 42 vzorcích – bramborové lupínky, sušenky, kukuřičný popcorn, kukuřičné lupínky, extrudované snídaňové cereálie pro děti a zapékané müsli. Přítomnost akrylamidu byla potvrzena ve všech analyzovaných vzorcích mimo dvou vzorků extrudovaných snídaňových cereálií. U jedenácti výrobků byly směrné hodnoty akrylamidu stanovené doporučením Komise (2013/647/EU) překročeny.

Jak již bylo uvedeno v práci, zároveň i dokázáno analýzou, hladiny akrylamidu u komerčně dostupných potravin se do značné míry liší nejen mezi jednotlivými značkami ale i mezi výrobními šaržemi výrobku. Příčinou by mohlo být složení konkrétní matrice nebo rozdílné podmínky zpracování (teplota, doba přípravy, druh oleje na smažení aj.) a skladování. Potravinářské podniky by měly nadále zkoumat metody výroby, zpracování potravin a snažit se o redukci akrylamidu ve výsledných výrobcích.

Nejohroženější skupinou populace při dietární expozici jsou nadprůměrní konzumenti potravin s vysokým obsahem sacharidů, které jsou upravovány při teplotách nad 120°C . Ve vařených potravinách akrylamid nebyl detekován. I když zatím neexistuje potvrzení karcinogenní toxicity na člověka, existuje doporučení omezit rizikové potraviny s vysokým obsahem akrylamidu a volit šetrnější tepelnou úpravu pokrmů. Důležité je aby strava byla pestrá a aby potraviny s vysokým obsahem akrylamidu nezaujímalys vysoké procento v naší stravě.

SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

SEZNAM MONOGRAFIÍ

1. Cisarová, Z., Kurková, K., Marková, L., Sádecká, J. & R. Belková. (2012) *Eliminácia akrylamidu: zvýšenie bezpečnosti a zachovanie klavity cereálnych potravín*. XLII. Symposium o nových směrech výroby a hodnocení potravin: sborník souhrnů sdělení. Praha: Výzkumný ústav potravinářský.
2. EFSA JOURNAL. (2012). Update on acrylamide levels in food from monitoring years 2007 to 2010. *EFSA Journal*, 10(10), 2938-. DOI: 10.2903/j.efsa.2012.2938..
3. EFSA JOURNAL. (2015). Scientific Opinion on acrylamide in food. *EFSA Journal*, 13(6), 4104- . DOI: 10.2903/j.efsa.2015.4104.
4. Fait, T., Vrablík M. & R. Češka. (2008). *Preventivní medicína*. Praha: Maxdorf. Jessenius.
5. IARC (1994) *IARC working group on the evaluation of carcinogenic risks to humus - Some industrial chemicals*. Secretariat of the World Health Organization, Lyon: 1994.
6. Klouda, P. (2003) *Moderní analytické metody*. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda.
7. Marková, L. Mešková, E., Sindler, W., Bednaríková, A., Kurková, Murkovic, M., ... Šimko, P. (2012). *Eliminácia akrylamidu: zvýšenie bezpečnosti a zachovanie klavity cereálnych potravín*. XLII. Symposium o nových směrech výroby a hodnocení potravin: sborník souhrnů sdělení. Praha: Výzkumný ústav potravinářský.
8. NATIONAL INDUSTRIAL CHEMICALS NOTIFICATION AND ASSESSMENT SCHEME. (2002) *Acrylamide* [online]. Sydney: NICNAS, 2002 [cit. 2017-03-13]. Dostupné z: <https://www.nicnas.gov.au/chemici-information/factsheets/chemicalname/akrylamide>
9. Preedy, V. (2014). *Coffee in health and disease prevention*. Academic Press.
10. Slavíková, P., Vytejková, S., Jirů, M., Bělková, B., Zachariášová, M., ... Hajšlová, J. (2015). Komplexní zhodnocení kvality a chemické bezpečnosti kávy. *XLV. Symposium o nových směrech výroby a hodnocení potravin: sborník souhrnů sdělení*. Praha: Výzkumný ústav potravinářský.
11. Skog K. & J. ALEXANDER. (2006) *Acrylamide and other hazardous compounds in heat-treated foods*. Cambridge, England: Woodhead Pub.

12. Sobotka, P.. (2014). EEG nálezy u pracovníků exponovaných akrylátům. *Plzeňský lékařský sborník*, 80, 51-55. Lékařská fakulta v Plzni.
13. Sobotka, P. (2015). Acrylamide toxicity. *Plzeňský lékařský sborník*, 81, 33-38. Lékařská fakulta v Plzni.
14. The CIAA. (2011) *Acrylamide „Toolbox“*. Confederation of the food and drink industries of the EU. 1-47.
15. Velíšek, J. & Hajšlová, J. (2009) *Chemie potravin 2*. Rozš. a přeprac. 3. vyd. Tábor: OSSIS.
16. Záruba, K. *Analytická chemie*. (2016). Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze.

SEZNAM PERIODIK

17. Adewale, O. O., Brimson, J. M., Odunola, O. A., Gbadegesin, M. A., Owumi, S., E., Isidoro, C. & T. Tencomnao. (2015). The Potential for Plant Derivatives against Acrylamide Neurotoxicity. *Phytotherapy Research*, 29(7), 978-985, DOI: 10.1002/ptr.5353.
18. Capueno, E. & Fogliano, V. (2011). Acrylamide and 5-hydroxymethylfurfural (HMF): A review on metabolism, toxicity, occurrence in food and mitigation strategies. *LWT - Food Science and Technology*, 44(4), 793-810. DOI: 10.1016/j.lwt.2010.11.002.
19. Ciesarová, Z. (2005). Minimalizácia obsahu akrylamidu v potravinách. *Chemické listy*, 99(7), s. 483-491. Dostupné z: www.chemicke-listy.cz/docs/full/2005_07_483-491.pdf
20. Cwиковá, O. (2014). Toxické účinky akrylamidu a jeho výskyt v potravinách. *Chemické listy*, 108(3), 205-210. Dostupné z: www.chemicke-listy.cz/docs/full/2014_03_205-210.pdf
21. Elbashir, A. A., Omar, M. M. A., Ibrahim, W. A. W., Schmitz, O. J., & Aboul-Enein, H. Y. (2014). Acrylamide Analysis in Food by Liquid Chromatographic and Gas Chromatographic Methods. *Critical Reviews In Analytical Chemistry*, 44(2), 107-141. DOI: 10.1080/10408347.2013.829388
22. Elmore, J. S., Mottram, D. S., Muttucumaru, N, Dodson, A. T., Parry M. A. J., & Halford, N. G. (2007). Changes in Free Amino Acids and Sugars in Potatoes Due to Sulfate Fertilization and the Effect on Acrylamide Formation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(13), 5363-5366. DOI: 10.1021/jf070447s.

23. Erkekoglu, P. & Baydar, T. (2010). Toxicity of acrylamide and evaluation of its exposure in baby foods. *Nutrition Research Reviews*, 23(02), 323-333. DOI: 10.1017/S0954422410000211.
24. Friedman, M. (2003) Chemistry, Biochemistry, and Safety of Acrylamide. A Review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51(16), 4504-26. DOI: 10.1021/jf030204+
25. Girma, K. B., Lorenz, V., Blaurock, S., & Edelman, F. T. (2005) Coordination chemistry of acrylamide. *Coordination Chemistry Reviews*. 249(11-12), 1283-93. DOI: 10.1016/j.ccr.2005.01.028
26. Hogervorst, J., G., Baars, B.-J., Schouten, L., J., Konings, E., J., M., Goldbohm, R., A., & Brandt, P. A. van den. (2010). The carcinogenicity of dietary acrylamide intake: A comparative discussion of epidemiological and experimental animal research. *Critical Reviews in Toxicology*, 40(6), 485-512. DOI: 10.3109/10408440903524254.
27. Kukurová, K., Marková, L., Bednářiková, A., & Čiesarová, Z. (2010) Nástroje znižovania akrylamidu v cereálných výrobkoch. *Potravinárstvo*, 4, 317-321. Dostupné z: http://www.potravinarstvo.com/dokumenty/mc_februar_2010/pdf/3/Kukurova.pdf
28. Lineback, D. R., Coughlin J. R., & Stadler, R. H. (2012). Acrylamide in Foods: A Review of the Science and Future Considerations. *Annual Review of Food Science and Technology*, 3(1), 15-35. DOI: 10.1146/annurev-food-022811-101114.
29. Muttucumaru, N., Elmore, J. S., Curtis, T., Mmttram, D. S., Parry, M. A. J., & Halford, N., G. (2008). Reducing Acrylamide Precursors in Raw Materials Derived from Wheat and Potato. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(15), 6167-72. DOI: 10.1021/jf800279d.
30. Negoita, M., & Culetu, A. (2016). Application of an Accurate and Validated Method for Identification and Quantification of Acrylamide in Bread, Biscuits and Other Bakery Products Using GC-MS/MS System. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 27(10). DOI: 10.5935/0103-5053.20160059.
31. Papoušek, R., Nováková, P., Marková, E., & Barták, P. (2013). Analýza akrylamidu metodou GC-MC. *Chemické listy*, 107, 255-260. Dostupné z: www.chemicke-listy.cz/docs/full/2013_03_255-260.pdf

32. Pennisi, M., Malaguarnera, G., Puglisi, V., Vinciguerra, L., Vacante, M., & Malaguarnera, M. (2013, September). Neurotoxicity of Acrylamide in Exposed Workers. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 10(9), 3843-54. DOI: 10.3390/ijerph10093843.
33. Sandler, R., H. & Scholz, G. (2004). Acrylamide: An Update on Current Knowledge in Analysis, Levels in Food, Mechanisms of Formation, and Potential Strategies of Control. *Nutrition Reviews*, 62(12), 449-467. DOI: 10.1301/nr.2004.janr.449-467.
34. Šucma, E., & Veselá, H. (2012, leden). Akrylamid – endogenní kontaminant potravin. *Veterinářství*, 62(10), 644-646.
35. Virk-Baker, M., K., Nagy, T., R., Barnes S., & Groopman, J. (2014). Dietary Acrylamide and Human Cancer: A Systematic Review of Literature. *Nutrition and Cancer*, 66(5), 774-790. DOI: 10.1080/01635581.2014.916323.
36. Vlčáková, M., & Vieriková, M.. (2010). Determination of Acrylamide in Food by Gas and Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *Potravinářstvo*, 4(3), 63-68. DOI: 10.5219/61.
37. Visvanathan, R., & Krishnakumar T. (2014). Acrylamide in Food Products: A Review. *Journal of Food Processing & Technology*, 5(7), 334-343. DOI: 10.4172/2157-7110.1000344.
38. Wenzl, T., M., Calle, M., B., de la, & Anklam, E. (2003). Analytical methods for the determination of acrylamide in food products: a review. *Food Additives and Contaminants*, 20(10), 885-902. DOI: 10.1080/02652030310001605051.
39. Zyzak, D., V., Sanders, R., A., Stojanovic, M., Tallmadge, D., H., Eberhart, B., L., Ewald, D., K., ... Villagran, M., D. (2003). Acrylamide Formation Mechanism in Heated Foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(16), 4782-4787. DOI: 10.1021/jf034180i

SEZNAM INTERNETOVÝCH ZDROJŮ

40. PUBCHEM: Acrylamide. USA: National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine [cit. 2017-03-15]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/acrylamide#section=Information-Sources>
41. Doporučení komise ze dne 3. května 2007 o monitorování množství akrylamidu v potravinách (2007/331/ES). In: *Eur-Lex: Access to European Union law* [online]. [cit.

- 2017-04-09]. Dostupné z: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/ALL/?uri=CELEX%3A32007H0331>
42. Doporučení komise ze dne 10 ledna 2011 o zkoumání množství akrylamidu v potravinách, K (2010), Brusel, 2011
43. Doporučení komise ze dne 8. listopadu 2013 o zkoumání množství akrylamidu v potravinách (2013/647/EU). In: *Eur-Lex: Access to European Union law* [online]. [cit. 2017-04-09]. Dostupné z: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/?uri=CELEX%3A32013H0647>
44. Vyhláška Ministerstva zdravotnictví č. 38/2001 Sb. o hygienických požadavcích na výrobky určené pro styk s potravinami a pokrmů. Sbírka zákonů č. 38. 2001, částka 13, 672. In: *Zakonyprolidi: Access to European Union law* [online]. [cit. 2017-04-09]. Dostupné z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2001-38>
45. Vyhláška Ministerstva zdravotnictví č. 252/2004 Sb. kterou se stanoví hygienické požadavky na pitnou a teplou vodu a četnost a rozsah kontroly pitné vody
46. US Department of Health and Human Service. (2012, September). Toxicological Profile for Acrylamide: Public Health Service Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Dostupné z: <https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp203-c2.pdf>
47. Zdravější hranolky. (2016). In *Biotrin*. [online]. [cit. 2017-04-09] Dostupné z <http://www.biotrin.cz/zdravejsi-hranolky/>

SEZNAM BAKALÁŘSKÝCH A DIPLOMOVÝCH PRACÍ

48. ERIKSSON, S. Acrylamide in food products: Identification, formativ and analytical methodology, Ph.D. Thesis. Stockholm: Stockholm Univerzity, Department of Environmental Chemistry, 2005, 91s.
49. KOPP, K. Biotransformation and Toxicokinetics of Acrylamide in Humans, Ph.D., Würzburg Universität, 2009, 173s.

SEZNAM OBRÁZKOVÝCH ZDROJŮ

50. Akrylamid - strukturní vzorec. In: *Wikipedia* [online]. [cit. 2017-04-09]. Dostupné z: <https://cs.wikipedia.org/wiki/Akrylamid#/media/File:Acrylamide-2D-skeletal.png>
51. Acrylamide powder. In: *Indiamart* [online]. [cit. 2017-04-09]. Dostupné z: <https://dir.indiamart.com/mumbai/acrylamide-powder.html>

52. Enzym Asparaginaza. In: *123rf* [online]. [cit. 2017-04-09]. Dostępne z:
[https://pl.123rf.com/photo_24079134_cz%C4%85steczka-enzymu-asparaginaza.-stosowany-w-leczeniu-bia%C5%82aczki-\(crisantaspase\).-atomy-przedstawion.html](https://pl.123rf.com/photo_24079134_cz%C4%85steczka-enzymu-asparaginaza.-stosowany-w-leczeniu-bia%C5%82aczki-(crisantaspase).-atomy-przedstawion.html)
53. Asparaginaza. In: *Wikipedia* [online]. [cit. 2017-04-09]. Dostępne z:
<https://pl.wikipedia.org/wiki/Asparaginaza#/media/File:3eca.jpg>

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

3-APA	3-aminopropionamid
3-MCPD	3-monochlorpropan-1,2-diol
CC FAC	Kodexový výbor pro potravinářské přídatné látky a kontaminanty
DAD	Detektor s diodovým polem
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
ECD	Detektor elektronového záchytu
EFSA	Evropský úřad pro bezpečnost potravin
ELISA	Imunochemická metoda (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay)
EPA	Agentura pro ochranu životního prostředí
ESI	Elektrosprejová ionizace
ESI+	Positivní elektrosprejová ionizace
FID	Plamenově-ionizační detektor
GC/MC	Plynová chromatografie spojená s hmotnostním detektorem
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HPLC/MS	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie s hmotnostním detektorem
IARC	Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny
IUPAC	Mezinárodní unie pro čistou a užitou chemii
JEFSA	Společný výbor FAO/WHO pro potravinářská aditiva a kontaminanty
JIFSAN	Společný ústav pro bezpečnost potravin a aplikované výživy
LC/MS	Kapalinová chromatografie spojená s hmotnostním detektorem
LC/MS/MS	Kapalinová chromatografie spojená s tandemovým hmotnostním detektorem
NOAEL	Dávka, při které ještě nebyl pozorován škodlivý účinek (No Observed Adverse Effect Level)
SPE	Extrakce tuhou fází (Solid Phase Extraction)
SZPI	Státní zemědělská a potravinářská inspekce
WHO/FAO	Světová zdravotnická organizace/Organizace pro výživu a zemědělství

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek č. 1 Strukturní vzorec akrylamidu [50]	10
Obrázek č. 2 Krystalická forma akrylamidu [51]	10
Obrázek č. 3 Způsob tvorby akrylamidu v potravinách [37]	23
Obrázek č. 4 Mechanismus tvorby akrylamidu v přítomnosti α -hydroxykarbonylových sloučenin [15]	24
Obrázek č. 5 Molekulární struktura asparaginázy [52] a Obrázek č. 6 Terciární struktura asparaginázy [53]	29
Obrázek č. 7 Kapalinový chromatograf QTRAP 5500 [vlastní zdroj]	37
Obrázek č. 8 Příprava vzorku (homogenizát) [vlastní zdroj]	39
Obrázek č. 9 Příprava vzorku (přečištění SPE) [vlastní zdroj]	39

SEZNAM TABULEK

Tabulka č. 1 Rozpustnost akrylamidu při 30 °C [48]	11
Tabulka č. 2 Expozice akrylamidem u různých věkových skupin [3]	14
Tabulka č. 3 Neurotoxicita akrylamidu (případové studie v literatuře) [32]	17
Tabulka č. 4 Koncentrace akrylamidu v potravinách [19]	21
Tabulka č. 5 Doporučené směrné hodnoty akrylamidu (2013/647/EU) [43]	33
Tabulka č. 6 Koncentrace akrylamidu v analyzovaných vzorcích ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)	41
Tabulka č. 7 Obsah akrylamidu v jednotlivých komoditách ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)	43

SEZNAM GRAFŮ

Graf č. 1 Koncentrace akrylamidu v analyzovaných vzorcích ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)	42
Graf č. 2 Porovnání hodnot akrylamidu ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)	44
Graf č. 3 Porovnání hladin akrylamidu u stejných výrobků různých šarží [$\mu\text{g.kg}^{-1}$]	45

EVIDENCE VÝPŮJČEK

Prohlášení:

Beru na vědomí, že odevzdáním této závěrečné práce poskytuji svolení ke zveřejnění a k půjčování této závěrečné práce za předpokladu, že každý, kdo tuto práci použije pro svou přednáškovou nebo publikační aktivitu, se zavazuje, že bude tento zdroj informací řádně citovat.

V Praze, 28. 04. 2017

Podpis autora závěrečné práce

Jako uživatel potvrzuji svým podpisem, že budu tuto práci řádně citovat v seznamu použité literatury.

[illegible]